

Τ.Ε.Ι. ΔΥΤ. ΕΛΛΑΔΑΣ
ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ

ΤΜΗΜΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ -
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΦΩΤΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ:
ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ,
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΕΣ:
ΘΕΟΦΙΛΟΣ ΧΟΥΛΙΑΡΑΣ &
ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΠΟΠΤΕΥΟΝ ΜΕΛΟΣ Ε.Π.:
Dr. Π. Ν. ΛΟΓΟΘΕΤΗΣ

Ι. Π. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2016

ΤΙΤΛΟΣ:

« Φωτοβακτηρίωση των Ιχθύων: Επικαιροποίηση δεδομένων στην διάγνωση, θεραπεία και πρόληψη της ασθένειας »

ΣΠΟΥΔΑΣΤΕΣ:

Θεόφιλος Χουλιάρης & Νικόλαος Γιαννακόπουλος

ΕΠΟΠΤΕΥΩΝ:

Π. Ν. Λογοθέτης, Επίκουρος Καθηγητής

Μεσολόγγι, Χειμ. Εξάμ. 2014-15

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους όσους βοήθησαν για την πραγματοποίηση αυτής της πτυχιακής και την ολοκλήρωση της. Πρώτα από όλα, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή μας κ. Λογοθέτη που ασχολήθηκε και αφιέρωσε χρόνο προκειμένου να ολοκληρωθεί αυτή η πτυχιακή εργασία. Ιδιαίτερες ευχαριστίες για τη σημαντική συμβολή της κατά την εκπόνηση αυτής της πτυχιακής, πρέπει να δοθούν στην απόφοιτο του τμήματος Επιστημών της Θάλασσας του Πανεπιστημίου Αιγαίου, Ατσαλάκη Άρτεμις, η οποία βοήθησε τόσο με τη βιβλιογραφία όσο και με τη διάρθρωση της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε προσωπικά τον κ. Πούλο για το χρόνο που μας διέθεσε αλλά και τη σημαντική βοήθεια και στήριξη που μας παρείχε καθ'όλη την διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος Επιστημών της Θάλασσας, κ. Μπακόπουλο, που μοιράστηκε μαζί μας τις γνώσεις και την εμπειρία του.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συνεχής εξέλιξη των ιχθυοπαθολογικών επιστημών δημιουργεί διαρκώς νέα δεδομένα ως προς την πληρέστερη κατανόηση των φαινομένων που απορρέουν από τις διάφορες ασθένειες αλλά και ως προς την καλύτερη αντιμετώπισή τους σε ένα πιο «τεχνικό» επίπεδο. Η ασθένεια που πραγματεύεται η παρούσα Πτυχιακή Εργασία είναι από τις παλαιότερες και σημαντικότερες στα πλαίσια της διεθνούς αλλά και της Ευρω-μεσογειακής και ελληνικής θαλασσοκαλλιέργειας. Ακολουθώντας το κλασικό σχήμα 'ασθένεια-διάγνωση-θεραπεία/πρόληψη' γίνεται μια προσπάθεια παρουσίασης των νεώτερων ευρημάτων της επιστήμης χωρίς, όμως, να αγνοούνται οι πιο παλιές γνώσεις πάνω στις οποίες, φυσικώ τω λόγω, οικοδομούνται οι νέες. Από την σύνθεση αυτή προκύπτει η σύγχρονη εικόνα του συγκεκριμένου νοσήματος με μεγαλύτερη ή μικρότερη έμφαση σε περισσότερο ή λιγότερο ουσιαστικές λεπτομέρειες. Η επιτυχία του εγχειρήματος, πάντοτε σε πλαίσια σχετικά, αποτελεί και το επιστέγασμα του εν γένει κύκλου σπουδών με κάποιον ιδιαίτερο προσανατολισμό στον χώρο της ιχθυοπαθολογίας παίρνοντας ως υπόδειγμα προς εστίαση ένα από τα χαρακτηριστικότερα 'κεφάλαια' αυτού του επιστημονικού πεδίου.

ΠΙΝΑΞ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ</u>	<u>σελίς</u>
I.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
II.	Η ΦΩΤΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗ ΩΣ ΙΧΘΥΟΑΣΘΕΝΕΙΑ	8
III.	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	16
IV.	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	19
V.	ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	24
-----	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

SUMMARY

In parallel with the development of the aquaculture industry, there have emerged several diseases affecting the reared organisms. Many of these diseases, in particular transmissible ones, can bring about important losses and, therefore, have an adverse economic impact for the aquaculture industry. Fish photobacteriosis is one such disease having serious implications in finfish mariculture while, also, occurring in wild fish populations. Basically, it is described as a septicemic bacteraemia and is caused by the obligatory pathogenic bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. This bacterium was originally classified in the genus *Pasteurella* and, thus, the disease became known initially by the name pasteurellosis or fish pseudotuberculosis after the characteristic pathology it may cause. The causative agent of this disease is highly pathogenic and without specific host preference; also, it can become endemic in an area and outbreaks occur under favourable conditions. Its diagnosis, after the clinical and post-mortem examination, is based on typical microbiology techniques (incl. the API-20E biochemical kit) as well as various serological techniques and, lately, on methods employing the PCR technology with increasing efficiency.

Albeit chemotherapeutic substances (mainly antibiotics) have been traditionally utilized in controlling outbreaks of this as well as other bacterial diseases, widespread use of these agents has led to the development of significant resistance in many of the pathogenic strains thereby reducing the effectiveness of the former. The focus has then shifted to the prevention of the disease; this goal can be attained either through breeding and/or the administration of special food supplements (e.g. amino-acids, vitamins, probiotics or immunoenhancers), or by vaccination which is now commonly applied. Many experimental and commercial vaccines have been used in various strategies of application and with varying degrees of success.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ιχθύες είναι ανώτερα ζώα (αν και κατώτερα σπονδυλωτά) και συνολικά αποτελούν ένα μεγάλο και ποικιλόμορφο σύνολο οργανισμών με εξάπλωση σε όλους σχεδόν τους υδροβιοτόπους του πλανήτη. Η βιομάζα που αντιπροσωπεύουν έχει τεράστια περιβαλλοντική αλλά και οικονομική σημασία, από την ανθρώπινη σκοπιά, λόγω του ό,τι χρησιμεύουν κυρίως ως τροφή αλλά έχουν και άλλες χρήσεις για τον ανθρώπινο πολιτισμό. Η εξαλίευσή τους αποτελεί πανάρχαιη ανθρώπινη δραστηριότητα ενώ, από παλιά, υπάρχει και η εκτροφή τους σε περισσότερο ή λιγότερο ελεγχόμενες συνθήκες. Η γενικότερη ραγδαία επιστημονική και τεχνολογική πρόοδος των τελευταίων δεκαετιών έχει οδηγήσει τόσο στην βαθύτερη γνώση των ιχθυολογικών φαινομένων όσο και στην παραγωγικότερη εκμετάλλευση της ιχθυοβιομάζας.

I.1. Εκτροφή ιχθύων

Στα πλαίσια του γενικότερου τεχνικο-οικονομικού κλάδου των υδατοκαλλιεργειών, η εντατική εκτροφή ιχθύων κατέχει εξέχουσα θέση και, ιδιαίτερα στην χώρα μας, αποτελεί σημαντικό παραγωγικό κλάδο κυρίως σε απομακρυσμένες περιοχές. Η σταθεροποίηση της παγκόσμιας και της εγχώριας αλιευτικής παραγωγής κατά τις πρόσφατες δεκαετίες σε συνδυασμό με την ολοένα και μεγαλύτερη ζήτηση αλιευτικών προϊόντων, οδήγησαν σε ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ελεγχόμενη εκτροφή υδρόβιων ζωικών οργανισμών με αποτέλεσμα την αντίστοιχη ανάπτυξη του κλάδου (FAO, 2006). Τις τελευταίες δεκαετίες (1980-2010), η παγκόσμια παραγωγή εκτρεφόμενων ψαριών αυξήθηκε σχεδόν 12 φορές, με μέσο ετήσιο ρυθμό που υπερέρχει σαφώς άλλων τομέων ζωικής παραγωγής (FAO, 2012). Σήμερα, οι εκτροφές αυτές συνεισφέρουν, κυρίως, στην:

- ✓ Παραγωγή τροφίμων για τον άνθρωπο.
- ✓ Τεχνητή βελτίωση των φυσικών ιχθυοαποθεμάτων για τον εμπλουτισμό φυσικών υδάτινων μαζών και την ερασιτεχνική αλιεία.
- ✓ Παραγωγή διακοσμητικών ειδών.
- ✓ Παραγωγή δολωμάτων για την αλιεία ιχθύων (Παπουτσόγλου, 1997).

Παγκοσμίως, η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια κυριαρχείται από τον σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*, L.) με κύριους παραγωγούς την Νορβηγία, την Χιλή, το Ηνωμένο Βασίλειο (Σκωτία), τον Καναδά, τις Φερόες και την Ιρλανδία (Toranzo *et al.*, 2005). Ωστόσο, σε σύνολο ειδών ψαριών, περιλαμβάνοντας και τα γλυκά νερά, οι κυριότερες χώρες παραγωγής ψαριών σε ιχθυοκαλλιέργειες παγκοσμίως είναι η Κίνα (με το 67% της παγκόσμιας παραγωγής, κυρίως σε κυπρινοειδή), η Ινδία, το Βιετνάμ, η Ιαπωνία και η Ινδονησία (FAO, 2012). Στην Δ. Ευρώπη, οι κυριότερες χώρες παραγωγής ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας είναι η Νορβηγία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Τουρκία, η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία, η Δανία και η Γαλλία. Στην παραγωγή των λεγόμενων ευρύαλων ειδών ψαριών (ήτοι, τσιπούρα και λαβράκι), η Ε.Ε. κατέχει την πρώτη θέση παγκοσμίως με σημαντική διαφορά από τον επόμενο παραγωγό (European Commission, 2012a; 2012b)· συγκεκριμένα, το σύνολο της παραγωγής από 92.310 τόνους το 1999 ανήλθε σε 175.196 τόνους το 2006, παρουσιάζοντας μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 9,6%. Άλλα είδη τα οποία εκτρέφονται σε Δυτικοευρωπαϊκές χώρες είναι η ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), το καλκάνι, το μυτάκι, το φαγκρί, ο κρανιός κ.λπ..

Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Μεσόγειο, τα τελευταία 25 χρόνια έχουν επεκταθεί και αναβαθμισθεί τόσο έντεκα σημαντικών ερευνητικών προσπαθειών στα πεδία της τεχνητής αναπαραγωγής και της καλλιέργειας γόνου, της παραγωγής ιχθυοτροφών, πιθανώς και της γενετικής βελτίωσης και μηχανικής, αλλά και λόγω της υποστήριξης που απέλαβε ο κλάδος των ιχθυοκαλλιεργειών μέσω εθνικών, ευρωπαϊκών και διεθνών προγραμμάτων χρηματοδότησης τα οποία συνέβαλαν στην μείωση του κόστους των παραγωγικών επενδύσεων, στη βελτίωση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος και, κυρίως, στη ενίσχυση της βιωσιμότητας του επιχειρήσεων (FAO, 2009). Η συνολική παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού στις μεσογειακές χώρες έφθασε σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, στους 253.000 τόνους το 2010, δηλαδή το 61% για την τσιπούρα και 39% για το λαβράκι παγκοσμίως (FAO, 2012). Μεταξύ των Μεσογειακών χωρών, η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή ευρύαλων ψαριών είναι η Ελλάδα η οποία κατετάγη πρώτη στην παραγωγή τσιπούρας στην Ευρώπη το 2008, παράγοντας 60.000 τόνους με μερίδιο 43,73% στην παγκόσμια αγορά, ενώ η συνολική

ποσότητα παραγωγής λαβρακιού το 2008 ήταν 105.900 τόνοι, από τους οποίους η Ελλάδα παρήγαγε το 33,05% επί του συνόλου (FISHSTAT & FEAP, 2008).

I.2. Θαλασσοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Οι «ιχθυοκαλλιέργειες» υπήρξαν κατά το πρόσφατο παρελθόν από τους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους αγροτο-βιομηχανικούς κλάδους στην Ελλάδα και, μάλιστα, με έντονα εξαγωγικό χαρακτήρα· η χώρα μας κατέχει την πρώτη θέση στην Ευρώπη στην παραγωγή ευρύαλων ψαριών σε θαλάσσιους κλωβούς παραμένοντας ο κυριώτερος παραγωγός στην Μεσόγειο – αν και με ισχυρό ανταγωνισμό από την Τουρκία (Monfort, 2006). Η συγκεκριμένη παραγωγική δραστηριότητα έχει ευνοηθεί από την ιδιαίτερα εκτεταμένη ακτογραμμή της χώρας η οποία προσφέρει πολλές θέσεις που συνδυάζουν προστασία από τον ισχυρό κυματισμό αλλά με καλή ανανέωση υδάτων και καλή ποιότητα των βασικών περιβαλλοντικών παραμέτρων, παράγοντες που είναι σημαντικοί για την δημιουργία θαλάσσιων παραγωγικών μονάδων· επίσης, έχουν συμβάλει σημαντικά και οι κλιματολογικές/ωκεανογραφικές συνθήκες της χώρας που ευνοούν την καλλιέργεια ευρύαλων ψαριών, το ανθρώπινο δυναμικό, το αναπτυξιακό ενδιαφέρον του Δημοσίου σε συνδυασμό με τα προγράμματα στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και, από την άλλη μεριά, η εν γένει μείωση των αλιευτικών αποθεμάτων και οι περιορισμοί που έχουν επιβληθεί τα τελευταία χρόνια στην ελεύθερη αλιεία.

Η Ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια ευρύαλων ψαριών αντιπροσωπεύει σήμερα περί το 50% της Ευρωπαϊκής και το 40% της Μεσογειακής παραγωγής. Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*, L.) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*, L.) αποτελούν σήμερα περίπου το 90% περίπου της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα, ενώ τα υπόλοιπα είδη, (π.χ. φαγκρί, μυτάκι, μυλοκόπι, κρانيός, λιθρίνι κ.ά.) παράγονται σε μικρότερες ποσότητες (Christofilogiannis, 2011). Η χώρα μας είναι ο μεγαλύτερος εξαγωγέας τσιπούρας και λαβρακιού σε παγκόσμιο επίπεδο, με το σύνολο των εξαγωγών της να σημειώνει την περίοδο 2006-2009 μέσο ετήσιο ρυθμό μεγέθυνσης 11% και να φτάνει το 2009 τους 103.000 τόνους, από 75.600 τόνους το 2006 (<http>¹). Οι εξαγωγές κατευθύνονται κυρίως στην Ιταλία, την Ισπανία και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Οι δε δυνατότητες για περαιτέρω επέκταση του κλάδου, με βάση και την

διαθέσιμη υψηλή τεχνογνωσία, είναι αρκετά υπολογίσιμες (Stirling report, 2004).

I.2.1. Ιχθυοπαθολογικά ζητήματα στις Ελληνικές θαλασσοκαλλιέργειες

Όπως είναι ευρέως γνωστό και παραδεκτό, οι ποικίλες ιχθυονόσοι συνιστούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς επηρεάζουν την παραγωγή της βιομάζας ευθέως και πλαγίως (επηρεάζοντας και την ανάπτυξη των ψαριών) με συνακόλουθη αύξηση του κόστους αλλά και πιθανώς προκαλώντας άλλα προβλήματα ως προς την ευζωία των ψαριών και ως προς την ποιότητα και την εμπορευσιμότητα του τελικού προϊόντος τα οποία μπορούν να επιπλέξουν περαιτέρω την τεχνική ευρρυθμία και την οικονομική ευρωστία των επιχειρήσεων· οι μολυσματικές νόσοι είναι, οπωσδήποτε, οι πλέον επικίνδυνες (Austin & Austin, 2007). Ευλόγως, δε, η επέκταση της εντατικής εκτροφής ψαριών έχει αυξήσει σημαντικά τους κινδύνους για εμφάνιση μολυσματικών νοσημάτων, παλαιών και νέων, σε παγκόσμιο επίπεδο. Έτσι, συχνά θεωρούνται ως ένας σημαντικός περιοριστικός παράγων για την ομαλή ανάπτυξη του κλάδου. Πολλά από τα μεταδοτικά νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών συχνά οφείλονται στην επαφή μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών η οποία πιθανώς οδηγεί σε ανταλλαγές βιοπαθογόνων ενώ και η δια-ειδική ποικιλία σε δεδομένους βιότοπους μπορεί να συμβάλλει προς την ίδια κατεύθυνση. Όπως είναι, δε, φυσικό τα νοσήματα που είναι περισσότερο γνωστά και έχουν μελετηθεί καλύτερα είναι αυτά που προσβάλλουν τους εκτρεφόμενους ιχθυοπληθυσμούς λόγω του οικονομικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν τα εκτρεφόμενα είδη (Newman, 1993).

Κατά το κλασσικό σχήμα του Snieszco (1954: αναφ. από Austin & Austin, 2007), η εκδήλωση μιας μεταδοτικής νόσου είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ τριών παραγόντων: του περιβάλλοντος, του προσβαλλόμενου οργανισμού και του βιοπαθογόνου μικροοργανισμού. Τα ψάρια υπό συνθήκες εντατικής καλλιέργειας επηρεάζονται συνεχώς από περιβαλλοντικές αλλαγές και διαχειριστικές πρακτικές (ήτοι, διαλογές, συνωστισμοί, μεταφορά, κακή διατροφή, μεταβολές θερμοκρασίας, χαμηλή οξυγόνωση και κακή ποιότητα νερού) που μπορούν να τους προκαλέσουν

καταπόνηση επιβαρύνοντας τους μηχανισμούς ομοιόστασης των ψαριών και, άρα, ευαισθητοποιώντας τα ψάρια σε ένα πλήθος βιοπαθογονικών παραγόντων (<http>²). Το υδάτινο περιβάλλον, με τις δεδομένες κατά περίπτωση φυσικοχημικές παραμέτρους του, μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στην παρουσία κάποιας προδιάθεσης για την εκδήλωση κάποιας ασθένειας από κάποιον τρίτο παθογονικό συντελεστή αλλά, βέβαια, και στη πρόκληση ασθένειας χωρίς την παρεμβολή κάποιου άλλου παράγοντα (Μπακόπουλος, 2010). Επομένως, προσοχή πρέπει να δίνεται τόσο στην τοποθεσία εκτροφής με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού που χρησιμοποιείται όσο και στη διαχείριση της εκτροφής και τις επιπτώσεις που αυτή μπορεί έχει αυτή στο στενότερο περιβάλλον και απευθείας στον εκτρεφόμενο οργανισμό· το εφαρμοζόμενο διατροφικό πρωτόκολλο μπορεί να έχει καθοριστική σημασία.

Επιπλέον, οφείλουμε να έχουμε υπόψη τον γενετικό παράγοντα διότι το κάθε εκτρεφόμενο άτομο έχει προέλθει από γεννήτορες οι οποίοι έχουν επιλεγεί λόγω συγκεκριμένων παραγωγικών χαρακτηριστικών όπως είναι ο γρήγορος ρυθμός αύξησης και η καλή μετατρεψιμότητα της τροφής. Επίσης, οι συνθήκες που επικρατούν στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς οδηγούν στην επιβίωση ατόμων τα οποία σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος ίσως να μην επιβίωναν. Τα παραπάνω οδηγούν συχνά στη καλλιέργεια ατόμων με μειωμένη ανθεκτικότητα σε πολλές ασθένειες. Τέτοια άτομα, αφού μολυνθούν, αναπτύσσουν γρήγορα την νόσο και τη μεταδίδουν και σε άλλα άτομα της ομάδας μαζί με τα οποία εκτρέφονται (Μπακόπουλος, 2010).

Ο τρίτος παράγοντας είναι η ενδεχόμενη παρουσία κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού στο άμεσο περιβάλλον των ψαριών η οποία είναι αναγκαία αλλά όχι και ικανή συνθήκη για την ανάπτυξη της αντίστοιχης ασθένειας στους εκτρεφόμενους οργανισμούς. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να απαντώνται σε συγκεκριμένες περιοχές έχοντας σαν αποτέλεσμα νόσους που είναι ενδημικές (Μπακόπουλος, 2010) αλλά και σε μεγαλύτερη κλίμακα οπότε αναφερόμαστε σε επιδημίες και πανδημίες. Αυξομειώσεις της θερμοκρασίας ή/και αλλαγές στην ποιότητα του νερού μπορεί να προκαλέσουν πληθυσμιακή έκρηξη στους μικροοργανισμούς, οπότε αυξάνεται το μικροβιακό φορτίο, αλλά και ταυτόχρονη καταπόνηση στα ψάρια κάνοντάς τα πιο ευαίσθητα σε παθογόνα. Επομένως,

απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή σε θέματα υγιεινής και καθαριότητας αλλά και σε τακτική παρακολούθηση των εκτρεφόμενων πληθυσμών (Αθανασοπούλου, 2006).

Από πλευράς ταξινομήσεως, τα νοσήματα των ψαριών, διακρίνονται ανάλογα με τα αίτια που τα προκαλούν σε:

- Νοσήματα που οφείλονται σε ιούς,
- Νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια,
- Νοσήματα που οφείλονται σε μύκητες,
- Νοσήματα που οφείλονται σε ευκαρυωτικά παράσιτα (Πρωτόζωα, Έλμινθες, Μαλάκια, Αρθρόποδα),
- Νοσήματα που οφείλονται σε παράγοντες του περιβάλλοντος και της διαχείρισης,
- Νοσήματα που οφείλονται σε διατροφικά/μεταβολικά αίτια, και
- Νεοπλασίες (Φώτης και Αγγελίδης, 2003).

I.2.1.1. Νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια

Τα βακτηριακά παθογόνα είναι σημαντική ομάδα βιοπαθογονικών μικροοργανισμών της οποίας τα μέλη μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές απώλειες σε εκτρεφόμενους κυρίως ιχθυοπληθυσμούς καθώς διαθέτουν, κατά κανόνα, υψηλή μολυσματικότητα. Η αποτελεσματική αντιμετώπισή τους στηρίζεται στην κατά το δυνατόν έγκαιρη και ορθή διάγνωση και στην ταχεία χορήγηση της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής (Noga, 2010). Τα βιοπαθογόνα αυτής της μεγάλης κατηγορίας περιλαμβάνουν μερικά υποχρεωτικώς παθογονικά είδη και πολλά ευκαιριακά· τα τελευταία προέρχονται είτε από την ενδημική μικροχλωρίδα είτε από ανθρωπογενή μόλυνση (Pereira *et al.*, 2011). Εν τούτοις, είναι σχετικά μικρός ο αριθμός των ιχθυοπαθογόνων βακτηρίων τα οποία, σε παγκόσμια κλίμακα, είναι υπεύθυνα για σοβαρές οικονομικές απώλειες· οι τελευταίες, όμως, δεν περιορίζονται μόνο σε υψηλή θνησιμότητα των εκτρεφόμενων ψαριών αλλά και σε πιθανές αλλοιώσεις, αν και χωρίς θνησιμότητα, οι οποίες καθιστούν προβληματική την εμπορική τους διάθεση (Toranzo *et al.*, 2005).

Οι βακτηριακές νόσοι χωρούν κατά το κλασσικό γενικό σχήμα όλων των μικροβιακών λοιμώξεων, ήτοι: 1) προσκόλληση και διείσδυση στους ιστούς του προσβαλλόμενου ατόμου, 2) επιβίωση, κίνηση/μεταφορά και πολλαπλασιασμός εντός του σώματος του ξενιστή οργανισμού, και 3) πρόκληση βλαβών και διαταραχών στον ξενιστή, οπότε και έχουμε την κλινική εκδήλωση της νόσου (Trust,

1974: αναφ. από Austin & Austin, 2007). Τα κλινικά συμπτώματα της κάθε βακτηριώσεως, όπως και η εν γένει πορεία της νόσου, εξαρτώνται από το είδος και την κατάσταση των προσβαλλόμενων ψαριών (π.χ. ηλικία), αφ' ενός, και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία) αφ' ετέρου. Επίσης, το στάδιο της νόσου και η εξέλιξή της εξαρτώνται όχι μόνο από το είδος του βιοπαθογόνου αλλά και από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της προσβολής· η τελευταία διαχωρίζεται σε τοπική (με συνήθως πιο χρόνια πορεία) και συστηματική (συνήθως οξείας ή υπεροξείας πορείας). Ιδιαίτερη μνεία χρήζει η περίπτωση των εξωτερικών τοπικών μολύνσεων που μπορεί να οδηγήσει σε συστηματικές επιπλοκές μέσω δευτερογενούς λοιμώξεως (Noga, 2010).

Η πλειονότητα των ιχθυοπαθογόνων βακτηρίων υπάγεται στα Gram-αρνητικά – αν και τα κατά Gram θετικά εκπροσωπούνται ικανοποιητικά (Μπακόπουλος, 2010). Τα κυριώτερα βακτηριακά παθογόνα περιλαμβάνουν είδη των δονακίων, των μυξοβακτηρίων, των στρεπτοκόκκων καθώς και άλλα, πλέον «ειδικά», όπως είναι τα: *Pseudomonas anguilliseptica*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, καθώς και το: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (θα αναφέρεται και ως *Phdp* για συντομία) το οποίο παρουσιάζεται αναλυτικά στα παρακάτω Κεφάλαια.

II. Η ΦΩΤΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗ ΩΣ ΙΧΘΥΟΑΣΘΕΝΕΙΑ

Πρόκειται για μια βακτηριογενή αιμορραγική σηψαιμία (στην τυπική, οξεία, μορφή της), γνωστή άλλοτε και ως ψευδοφυματίωση των ιχθύων διότι, σε χρόνιες περιπτώσεις, τα αιμοποιητικά όργανα παρουσιάζουν υπόλευκα οζίδια ένεκα κοκκιωματώδους φλεγμονής (Magariños *et al.*, 1996c). Ο αιτιολογικός παράγοντας είναι το βακτήριο *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* (για συντομία, θα αναφέρεται και ως *Phdp*), το οποίο αρχικά είχε ονομαστεί *Pasteurella piscicida* και για αυτό το λόγο η ασθένεια στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης ως παστερέλλωση ή παστεριδίαση (Μπακόπουλος, 2010). Η φωτοβακτηρίωση είναι μία από τις πιο επικίνδυνες ασθένειες των ψαριών λόγω της μεγάλης γεωγραφικής εξάπλωσης, του μεγάλου αριθμού ξενιστικών ειδών, καθώς και της υψηλής μολυσματικότητας και παθογονικότητας που χαρακτηρίζουν το αντίστοιχο βιοπαθογόνο (Barnes *et al.*, 2005). Θεωρείται από παλιά ως ενδημική στην Μεσόγειο όπου εκδηλώνεται όποτε οι περιβαλλοντικές συνθήκες το ευνοούν (Bakoroulos *et al.*, 1995).

II.1. Ιστορικά, Γεωγραφική και Ξενιστική κατανομή

Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά στις ανατολικές ακτές των Η.Π.Α., το καλοκαίρι του 1963, ως αιτία μαζικής θνησιμότητας σε άγριους πληθυσμούς τοπικής πέρκας (*Morone americanus*, Gmelin) και λαβρακιού (*Morone saxatilis*, Walbaum). το βακτήριο ταξινομήθηκε στο γένος *Pasteurella* (Snieszko *et al.*, 1964) ενώ, αργότερα, προτάθηκε το δυώνυμο *Pasteurella piscicida* (Janssen και Surgalla, 1968). Στην Ιαπωνία η νόσος έχει αναφερθεί την ίδια περίπου περίοδο από μια σειρά εκτρεφόμενων ειδών (π.χ. Muroga *et al.*, 1977). Η ονομασία της ασθένειας ως παστερέλλωση (fish pasteurellosis) προκάλεσε κάποια σύγχυση διότι η νόσος αναφερόταν στην Ιαπωνία ως «ψευδοφυματίωση» (pseudotuberculosis) λόγω της ιδιαίτερης οργανικής παθολογίας που εμφάνιζε (Austin and Austin, 2007).

Η πρώτη αναφορά της παστερέλλωσης στην Ευρώπη έγινε από τους Toranzo *et al.* (1991) σε ιχθύδια εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*, L.) στην βορειοδυτική Ισπανία (κεντρανατολικός Ατλαντικός). Σύντομα αναφέρθηκαν κι άλλα περιστατικά από άλλες Μεσογειακές χώρες, ως επί το πλείστον από τα καλλιεργούμενα ευρύαλα είδη. Για παράδειγμα, στην Ιταλία το βιοπαθογόνο

απομονώθηκε και από άγρια και από εκτρεφόμενα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*, L.), κεφαλοειδή (*Mugillidae*), τσιπούρες, φαγγριά (*Pagrus pagrus*, L.) και γλώσσες (*Solea solea*, L.) (Ceschia *et al.*, 1991). Οι αναφορές της νόσου επεκτάθηκαν σε καλλιέργειες τσιπούρας και λαβρακιού της νοτιοδυτικής Ισπανίας (Balebona *et al.*, 1992), της Ελλάδας (Bakoroulos *et al.*, 1995), της Τουρκίας (Candan *et al.*, 1995), της Πορτογαλίας (Baptista *et al.*, 1996), της Μάλτας (Bakoroulos *et al.*, 1997a) και του Ισραήλ (Kvitt *et al.*, 2002). Έκτοτε, η ασθένεια έχει παρατηρηθεί σε πολλούς άγριους και εκτρεφόμενους πληθυσμούς και είδη σημαντικής οικονομικής αξίας (Serracca *et al.*, 2011; Mancuso, 2012).

II.2. Αιτιοπαθογονικός συντελεστής

Ο αιτιολογικός παράγων είναι ένα Gram αρνητικό, μη κινητό, διπολικής χρώσεως βακτήριο σχήματος κοντού, ευθέος βακίλου. Μετά τις αρχικές μελέτες (Snieszko *et al.*, 1964; Janssen και Surgalla, 1968), διαπιστώθηκε ότι όντως διαθέτει τα βασικά χαρακτηριστικά του *Pasteurella* εκτός από την ικανότητα μετατροπής των νιτρικών σε νιτρώδη (Magariños *et al.*, 1996c). Όμως, αυτή η κατάταξη του αμφισβητήθηκε λόγω σοβαρών φυσιολογικών ασυνεπειών όπως η αλοφιλία, η ανοχή σε pH εκτός του συνήθους φάσματος, η χαμηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, και το ασυνήθιστα ευρύ φάσμα ξενιστών (Hawke, 2012). Τελικώς, οι σχετικές έρευνες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο βιοπαθογόνο πρέπει να υπαχθεί στο γένος *Photobacterium* με την ονομασία *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* (Thyssen *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2001; Dalla Valle *et al.*, 2002; Andreoni and Magnani, 2014).

II.2.1. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

II.2.1.1. Οικολογία

Βάσει πειραμάτων από τους Toranzo *et al.* (1982), συμπεραίνεται ότι η επιβίωση του *Phdp* σε υφάλμυρα ύδατα (π.χ. σε εκβολές ποταμών) ήταν λίγο καλύτερη σε σχέση με τα γλυκά νερά· επιπλέον, οι Magariños *et al.* (1994a) απέδειξαν ότι το *Phdp* μπορεί να επιβιώσει στο θαλασσινό νερό και το ίζημα από 6 με 12 ημέρες μειώνοντας το μεταβολισμό του έως και 80%.

II.2.1.2. Καλλιέργεια *in vitro* και Αποικιακή Μορφολογία

Το *Phdp* μπορεί εύκολα να καλλιεργηθεί και να απομονωθεί σε θρεπτικά βακτηριολογικά άγαρ γενικών χρήσεων όπου πρέπει απαραίτητα να έχει προστεθεί NaCl (Magariños *et al.*, 1996c). Σύμφωνα με τους Magariños *et al.* (1992b), το *Phdp* έχει βέλτιστη ανάπτυξη στους 22,5-30,0°C ενώ χρειάζονται 48-72 ώρες για να εμφανιστούν οι διαμέτρου 1-2 mm αποικίες. Οι αποικίες του *Phdp* είναι λείες, κυρτές και παχύρρευστες, ημιδιαφανείς έως αδιαφανείς, χρώματος γκριζου έως ανοιχτού κίτρινου (Mladineo *et al.*, 2006; Austin and Austin, 2007).

II.2.1.3. Μορφολογικές, Βιοχημικές και Ορολογικές Ιδιότητες

Το *Phdp* είναι ένας σχετικά αδρανής οργανισμός που το σχήμα του ποικίλει από κοκκοβάκιλος έως πιο νηματοειδείς μορφές (Bakopoulos *et al.*, 1995; Magariños *et al.*, 1996c; Mladineo *et al.*, 2006). Οι Snieszko *et al.* (1964) πρότειναν ότι αυτός ο πολυμορφισμός των κυττάρων επηρεάζεται πολύ από τη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου στο μέσο ανάπτυξης. Οι Magariños *et al.* (1996c) έδειξαν ότι το *Phdp* ήταν σε θέση να παράγει υλικό κάψας η οποία, μάλιστα, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογονικότητα αυτού του μικροοργανισμού (Acosta *et al.*, 2006).

Ανεξάρτητα από γεωγραφική προέλευση και πηγή απομόνωσης, όλα τα στελέχη αυτού του παθογόνου θεωρούνται ως βιοχημικά και ορολογικά ομοιογενή (Magariños *et al.*, 1992a; b; Bakopoulos *et al.*, 1995; 1997d) αν και νεώτερες τεχνικές κατέδειξαν ότι υπάρχουν δύο διαφορετικές καταγωγές των στελεχών του *Phdp*: μια από την Ευρώπη και μια από Αμερική και Ιαπωνία (Thyssen *et al.*, 1998; 2000; Magariños *et al.*, 2000; Kvitt *et al.*, 2002; Toranzo *et al.*, 2005).

Βιοχημικά, το βακτήριο είναι προαιρετικά αναερόβιο, θετικό στην καταλάση και την οξειδάση, και παράγει οξύ αλλά όχι αέριο από γλυκόζη, μαννόζη, μαλτόζη, φρουκτόζη και γαλακτόζη ενώ η μελιβιόζη και η σακχαρόζη ζυμώνονται αναεροβικά· η δοκιμασία του ερυθρού του μεθυλίου είναι έντονα θετική ενώ αυτή των Voges-Proskauer είναι ασθενώς θετική (Snieszko *et al.*, 1964; Janssen and Surgalla, 1968; Austin and Austin, 2007; Hawke, 2012). Επίσης, το βακτήριο είναι ευαίσθητο στον δονακιοστατικό παράγοντα O/129 και στην πενικιλίνη (Toranzo *et al.*, 1991; Magariños *et al.*, 1992b; Mladineo *et al.*, 2006).

Ο μικρο-οργανισμός αυτός διαθέτει ένα θερμικά σταθερό και τέσσερα θερμοευαίσθητα σωματικά αντιγόνα καθώς και τρία θερμοευαίσθητα εξωκυτταρικά αντιγόνα (Kusuda *et al.*, 1978). Νεώτερες μελέτες από τους Remuzgo-Martínez *et al.* (2014) αποκάλυψαν την παρουσία μικρών επιφανειακών νηματιδίων (pili) σε αρκετά στελέχη *Phdp* τα οποία πιθανότατα προσδίδουν την ικανότητα για προσκόλληση και περιορισμένη κινητικότητα σε στερεές επιφάνειες.

II.3. Επιδημιολογία

Το *Phdp* είναι υποχρεωτικά παθογόνο με μικρή ικανότητα επιβίωσης εκτός των ξενιστών του αν και μπορεί να επιβιώσει στο νερό σε μη καλλιεργήσιμη, αδρανή ή τροποποιημένη μορφή (Magariños *et al.*, 1994a; Austin and Austin, 2007)· αυτά τα αδρανή αλλά βιώσιμα κύτταρα του *Phdp* διατηρούν την παθογονικότητά τους και μπορούν ταχέως να επανέλθουν σε μολυσματική κατάσταση όταν οι θρεπτικές συνθήκες είναι κατάλληλες (Magariños *et al.*, 1996c). Σε τοποθεσίες όπου η ασθένεια έχει γίνει ενδημική, άγρια ψάρια γύρω από τις εγκαταστάσεις εκτροφής μεταφέρουν στο σώμα τους το παθογόνο και, οπωσδήποτε, μπορούν να λειτουργήσουν ως εστία μόλυνσης για τα μη μολυσμένα ψάρια· με αυτό τον τρόπο, και με δεδομένο ότι η νόσος μπορεί να προσβάλλει ευρύ φάσμα ξενιστών και να υπάρχει σε διάφορες χρονολογικές εκδηλώσεις, η ιδιότητα του υποχρεωτικώς παθογόνου δεν συνιστά μειονέκτημα για την διασπορά της ασθένειας. Ιχθυοπληθυσμοί που ευρίσκονται σε ευαίσθητη φυσιολογική κατάσταση μπορούν, συνεπώς, να εκδηλώσουν την νόσο σε κάποια μορφή της μολυνόμενοι από τα βιώσιμα παθογόνα τα οποία σε κάποια πυκνότητα θα υπάρχουν, περισσότερο ή λιγότερο συνεχώς, σε αρκετές θαλάσσιες περιοχές.

Πέραν της απλής επαφής με το βιοπαθογόνο μέσω του περιβάλλοντος νερού, έχει, επίσης, θεωρηθεί ως πιθανό να μεταδίδεται η ασθένεια μέσω του στόματος οπότε η σίτιση με μολυσμένα ψάρια θα μπορούσε να αποτελέσει μια αιτία μόλυνσης (Tung *et al.*, 1985). Πειράματα από τους Magariños *et al.* (1995b) κατέληξαν ότι, τουλάχιστον για την τσιπούρα και το λαβράκι, το δέρμα θα μπορούσε να αποτελεί πιθανή είσοδο του παθογόνου στο σώμα των ψαριών ενώ, άλλες έρευνες δείχνουν ότι τα βράγχια είναι το κλειδί για την ανάπτυξη της νόσου (Austin and Austin, 2007).

Η ασθένεια εμφανίζεται συνήθως από τα τέλη άνοιξης μέχρι τα μέσα φθινοπώρου (Bullock, 1978; Toranzo *et al.*, 1991; Balebona *et al.*, 1992). Κρούσματα της ασθένειας, σε τσιπούρες, έχουν καταγραφεί σε ένα εύρος θερμοκρασίας από 14 έως 29°C αν και οι βέλτιστες θερμοκρασίες για την εμφάνιση της οξείας μορφής της νόσου είναι 18-25°C (Hawke, 2012). Στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (κάτω από 15°C) τα ψάρια μπορεί φέρουν το παθογόνο σε μια υποκλινική μορφή μόλυνσης και για μεγάλες περιόδους αλλά όταν η θερμοκρασία αυξηθεί τότε η ασθένεια αναπτύσσεται κανονικά (Magariños *et al.*, 2001)· αυτές οι λανθάνουσες λοιμώξεις αναμφίβολα συντελούν στην ενδημικότητα του νοσήματος. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει και το ενδεχόμενο κάθετης μετάδοσης καθώς ιχθύδια που προήλθαν από γεννήτορες ασυμπτωματικούς φορείς του βιοπαθογόνου ήταν επίσης φορείς και ενόσησαν μόλις οι συνθήκες έγιναν κατάλληλες για την εκδήλωση της ασθένειας (Magariños *et al.*, 2001).

II.4. Παθογένεση

Το *Phdp* είναι, σε γενικές γραμμές, πολύ παθογονικό και χωρίς σαφή προτίμηση για ωρισμένους ξενιστές (Magariños *et al.*, 1992a; 1996c; Acerete *et al.*, 2009). Σε ό,τι αφορά τις ενδοειδικές καταστάσεις, τα νεαρότερα ψάρια φαίνεται να είναι περισσότερο ευάλωτα από τα μεγαλύτερα (Bullock, 1978; Toranzo *et al.*, 1991). Για παράδειγμα, στην τσιπούρα περισσότερο επιρρεπείς στην ασθένεια είναι οι προνύμφες και τα ιχθύδια τα οποία κατά κανόνα προσβάλλονται από την οξεία μορφή της με θνησιμότητες που μπορεί να φτάσουν έως και το 90-100% του πληθυσμού (Toranzo *et al.*, 1991)· απεναντίας, τσιπούρες μεγαλύτερες των 50g είναι πιο ανθεκτικές στη λοίμωξη πράγμα που πιθανότατα οφείλεται στην πιο αποτελεσματική φαγοκυττάρωση και την ενδοκυτταρική θανάτωση των βακτηρίων από τα φαγοκύτταρα των περισσότερο ανεπτυγμένων ψαριών (Noya *et al.*, 1995a; Toranzo *et al.*, 2005). Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και στο λαβράκι από τους do Vale *et al.* (2002).

Παρόλη τη φαινοτυπική ομοιογένεια που παρουσιάζουν τα στελέχη του *Phdp*, έχει παρατηρηθεί ένας μη υψηλός βαθμός ομοιογένειας σε ό,τι αφορά την πειραματική παθογονικότητα μεταξύ διαφόρων στελεχών του βακτηρίου· το LD₅₀ έχει μετρηθεί από 10³ έως 10⁶ βακτηριακά κύτταρα/ml για ενδοπεριτοναϊκή έγχυση και από

10^5 με 10^6 κύτταρα/ml για εμβάπτιση (Magariños *et al.*, 1992a; 1995a; 1996c; Toranzo *et al.*, 2005).

II.4.1. Μηχανισμοί

Προκειμένου να προκληθεί η μόλυνση και να επακολουθήσει η νόσος, το παθογόνο πρέπει κατ' αρχήν να μπορέσει να προσκολληθεί και να εισέλθει στους ιστούς ή τα κύτταρα του ξενιστή, να εδραιωθεί και πολλαπλασιαστεί εκεί, παράλληλα να μπορέσει να αντισταθεί ή να αποφύγει το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και, τέλος, να προκαλέσει κάποια βλάβη (Magariños *et al.*, 1996c). Το *Phdp* φαίνεται να έχει μέτρια ή ασθενή ικανότητα προσκόλλησης σε κυτταρικές σειρές ψαριών (Magariños *et al.*, 1996a). Η προσκόλληση γίνεται με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης ή γλυκοπρωτεΐνης στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου και η είσοδος των βακτηρίων ίσως συνδέεται με τον κυτταρικό μεταβολισμό· ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός εισόδου είναι ακόμα άγνωστος (Acosta *et al.*, 2009; Andreoni and Magnani, 2014).

Τα εξωκυτταρικά προϊόντα (ECPs) είναι αποφασιστικής σημασίας για την παθογονικότητα του βακτηρίου αφ' ενός μεν διότι το βοηθούν να αντισταθεί ενεργά, μέσω της κυτταροτοξικότητας, στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Magariños *et al.*, 1996c; Romalde, 2002; Roulos *et al.*, 2004) ενώ, αφ' ετέρου, περιέχουν τοξίνες, με σημαντική αιμολυτική δραστηριότητα, οι οποίες έχουν ισχυρή δράση ακόμη και στους 37°C, με το LD₅₀ των ECPs να κυμαίνεται από 1 έως 4.6μg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο ψαριού για την τσιπούρα, το λαβράκι, το καλκάνι και την ιριδίζουσα πέστροφα (Magariños *et al.*, 1992a). Αποπτωτικοί παράγοντες (π.χ. η εξωτοξίνη AIP56), πιθανώς κωδικοποιούμενοι από πλασμίδια, καταστρέφουν τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα κύτταρα παρακάμπτοντας, έτσι, τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (do Vale *et al.*, 2003; 2005). Τα εξωκυτταρικά προϊόντα που παράγονται *in vivo* έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα από αυτά που παράγονται *in vitro* (Bakoroulos *et al.*, 2004) ενώ, εξ άλλου, οι φωσφολιπάσες έχουν συνδεθεί με τις ιστολογικές αλλοιώσεις (Noya *et al.*, 1995a).

Η πολυσακχαριδική κάψα σχετίζεται με την αντίσταση στην βακτηριοκτόνο δράση του ορού του αίματος και με την αύξηση στη θνησιμότητα των ψαριών (Magariños *et al.*, 1996b; Arijo *et al.*, 1998; Acosta *et al.*, 2003). Η δράση της ενισχύεται από την παρουσία σίδηρου και πιθανόν να επηρεάζει την ενδοκυτταρική

επιβίωση του παθογόνου προσφέροντας προστασία απέναντι στις ανειδίκευτες άμυνες του ξενιστή (Magariños *et al.*, 1996a; Acosta *et al.*, 2006). Άλλη δυνατότητα για άμυνα του παθογονικού μικροοργανισμού ενάντια στην ενδοφαγοκυτταρική πέψη του φαίνεται να είναι η ενζυματική του δραστηριότητα (Díaz-Rosales *et al.*, 2006a).

Άλλος σημαντικός παθογονικός μηχανισμός του *Phdp* είναι η δυνατότητα για δέσμευση σιδήρου από τον ξενιστή μέσω ειδικών εκκρινικών προϊόντων (σιδηροφόρων) τα οποία μεταφέρουν σίδηρο στα βακτήρια πράγμα σημαντικό για την ανάπτυξή τους (Magariños *et al.*, 1994b). Τα βακτηριακά κύτταρα παράγουν στην εξωτερική τους μεμβράνη ειδικές πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από τον διαθέσιμο σίδηρο και μεταφέρουν τις ενώσεις σιδηροφόρων-σιδήρου εντός των κυττάρων (Bakopoulos *et al.*, 1997b). Ο σίδηρος φαίνεται να παίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση ορισμένων πρωτεολυτικών ενζύμων από το *Phdp* (Magariños *et al.*, 1994b). Επιπλέον, ψάρια που ελάμβαναν συμπληρώματα σιδήρου βρέθηκαν να είναι πιο επιρρεπή στη φωτοβακτηρίωση και με υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (Rodrigues και Pereira, 2004).

II.5. Παθολογία και κλινική εικόνα

Το *Phdp* μπορεί να δημιουργήσει μια αρκετά σύνθετη παθολογία στην οποία εμπλέκονται διάφοροι ιστοί και όργανα των προσβληθέντων ψαριών (Bullock, 1978). Σε γενικές γραμμές, ορίζονται δύο μορφές της νόσου, η οξεία και η χρόνια· η τελευταία εμφανίζεται συνήθως σε ψάρια τα οποία είτε επιβίωσαν της οξείας μορφής είτε ευρίσκονταν έξω από τις βέλτιστες θερμοκρασίες για μια σχετικώς ταχεία κλινική εκδήλωση της νόσου (Thune *et al.*, 1993). Στην οξεία μορφή της ασθένειας παρατηρείται συνήθως υψηλή νοσηρότητα στον πληθυσμό, συνοδευόμενη και από σημαντική θνησιμότητα, αλλά χωρίς να υπάρχουν ιδιαίτερος εμφανή κλινικά συμπτώματα, ενώ η χρόνια μορφή δίνει χαμηλότερα επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας με χαρακτηριστικές βλάβες στα εσωτερικά όργανα (Magariños *et al.*, 1996c; Μπακόπουλος, 2010).

II.5.1. Κλινικά συμπτώματα

Η κλινική εικόνα της φωτοβακτηρίωσης είναι, κατ' αρχήν, η χαρακτηριστική της σηψαιμίας, δηλ. ληθαργικά ψάρια που κολυμπούν αργά κοντά στην επιφάνεια και τελικά βυθίζονται στον

πυθμένα λίγο πριν τον θάνατο· τα εξωτερικά συμπτώματα είναι δυσδιάκριτα ανεξαρτήτως του προσβεβλημένου είδους (Toranzo *et al.*, 1991; Magariños *et al.*, 1996c). Στην οξεία μορφή της ασθένειας απαντάται αποχρωματισμός ή πιο σκούρος χρωματισμός, ανορεξία (Kubota *et al.*, 1970; Bullock, 1978; Ceschia *et al.*, 1991; Baudin-Laurencin *et al.*, 1991), και κοιλιακή διάταση (Balebona *et al.*, 1992)· επίσης, είναι δυνατόν να υπάρχουν ωχρότητα των βραγχίων και πετέχειες στο βραγχιακό επικάλυμμα (Hawke, 2012), καθώς και μικρές αιμορραγικές εστίες στο δέρμα της κεφαλής και των βάσεων των πτερυγίων (Bullock, 1978; Tung *et al.*, 1985; Toranzo *et al.*, 1991). Στην χρόνια μορφή τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με το είδος, τη θερμοκρασία του νερού, καθώς και με τυχόν χημειοθεραπευτική παρέμβαση (Hawke, 2012).

II.5.2. Ανατομική παθολογία

Η νεκροτομή συνήθως αποκαλύπτει ωχρότητα στο ήπαρ και τους νεφρούς (Balebona *et al.*, 1992), μικρο-ερυθήματα και πετέχειες σε άλλα όργανα (Ceschia *et al.*, 1991), και διογκωμένο σπλήνα και αιμορραγικούς νεφρούς τα οποία συχνά φέρουν υπόλευκα οζίδια διαμέτρου περί τα 1-2mm (Hawke, 2012). Αυτά τα οζίδια είναι χαρακτηριστικά της χρόνιας μορφής της νόσου (οπότε και τείνουν να είναι μεγαλύτερα και λευκότερα) και αποτελούνται από νεκρωτικό υλικό, επιθηλιοειδή και μακροφάγα κύτταρα σε διάφορα εκφυλιστικά στάδια (μερικά από αυτά είναι γεμάτα με άθικτα βακτήρια) καθώς και από ινώδη ιστό (Kubota *et al.*, 1970; Bullock, 1978; Baudin-Laurencin *et al.*, 1991; Toranzo *et al.*, 1991). Από την άλλη πλευρά, στην οξεία μορφή της φωτοβακτηρίωσης, η ιστοπαθολογική εξέταση δείχνει οξείες νεκρωτικές αλλοιώσεις των παρεγχυματικών οργάνων, κυρίως στη σπλήνα και τους νεφρούς και κάποια μέτρια πολυεστιακή νέκρωση στο ήπαρ και το πάγκρεας (Toranzo *et al.*, 1991). Γενικά παρατηρείται συσσώρευση βακτηριακών κυττάρων μέσα σε φαγοκύτταρα τα οποία δημιουργούν έμβολα στα τριχοειδή εμποδίζοντας, έτσι, την ροή του αίματος εντός των οργάνων (Noya *et al.*, 1995a; Magariños *et al.*, 1996c) των βραγχίων μη εξαιρουμένων (Hawke, 2012).

III. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διαφορική διάγνωση είναι ίσως εφικτή σε χρόνιες περιπτώσεις της νόσου όταν τα κλινικά συμπτώματα σε συνδυασμό με τα νεκροτομικά ευρήματα μπορούν να οδηγήσουν σε μια προσωρινή διάγνωση της νόσου στηριζόμενη κυρίως στην παρουσία των οζιδίων στα λεμφοειδή όργανα των ψαριών.

Η οριστική διάγνωση της φωτοβακτηρίωσης εξαρτάται, εξ ορισμού, από την αναγνώριση του βιοπαθογόνου μετά την απομόνωσή του από νοσούντα άτομα και, παραδοσιακά, διενεργείται με χρονοβόρες μικροβιολογικές τεχνικές που βασίζονται στην καλλιέργεια και απομόνωσή του παθογόνου από τα εσωτερικά όργανα άρρωστων ψαριών ακολουθούμενες από βιοχημικές και ορολογικές τεχνικές για τον χαρακτηρισμό του. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια του παθολογικού υλικού γίνεται σε Marine Agar 2216E ή σε ανάλογα βακτηριολογικά θρεπτικά μέσα εμπλουτισμένα με 1-2% NaCl· η απομόνωση γίνεται μετά από 2 έως 4 ημέρες επώασης στους 22°C και η ταυτοποίηση γίνεται στη βάση των μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του παθογόνου (Bullock, 1978; Magariños *et al.*, 1996c; Hawke, 2012). Ωστόσο, η βιοχημική ανάλυση μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη αναγνώριση λόγω της μεταβλητότητας στον μεταβολισμό του στελέχους (Thyssen *et al.*, 1998; Botella *et al.*, 2002)· μάλιστα, για κάποια ειδικά χαρακτηριστικά (π.χ. τις δοκιμασίες Voges-Proskauer και ερυθρού του μεθυλίου) θεωρείται αναγκαία η επιβεβαίωση (Bakopoulos *et al.*, 1995). Η σχετικά αργή ανάπτυξη του *Phdp*, η πιθανή αναστολή της από άλλα βακτήρια που υπάρχουν στα ίδια δείγματα αλλά αναπτύσσονται ταχύτερα (Dalla Valle *et al.*, 2002; Romalde, 2002), καθώς και η παρουσία του παθογόνου σε μια πιθανώς μη καλλιεργήσιμη μορφή (Magariños *et al.*, 1994a; Amagliani *et al.*, 2009) μπορούν να συντελέσουν σε αποτυχία αυτής της διαγνωστικής προσέγγισης.

Περαιτέρω, προκειμένου για την φαινοτυπική αναγνώριση του βιοπαθογόνου, η εμπορική βακτηριολογική συστοιχία βιοχημικών δοκιμασιών ονομαζόμενη «API-20E» χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του *Phdp* στο εργαστήριο αν και με επιφυλάξεις (Magariños *et al.*, 1992b; Bakopoulos *et al.*, 1995). Σε αυτή τη συστοιχία, το είδος *Photobacterium damsela* δίνει γενικά αποτέλεσμα 2005004 για το υποείδος *piscicida* και 2015004 για το

υποείδος *damselae* (Toranzo *et al.*, 1991)· η διαφοροποίηση του υποείδους *damselae* μπορεί επίσης να βεβαιωθεί με πρόσθετες δοκιμασίες, π.χ. η αύξηση σε TCBS και η παραγωγή ουρεάσης που δίνουν αρνητικά αποτελέσματα για τα στελέχη του *Phdp* (Thyssen *et al.*, 1998). Εν τούτοις, το «API-20E» δεν είναι αρκετά οικονομικό για το συγκεκριμένο βιοπαθογόνο επειδή θετικά αποτελέσματα κατά τη διάγνωση του *Phdp* προκύπτουν από λίγες σχετικά από τις δοκιμασίες που περιλαμβάνει (Austin and Austin, 2007).

Πέραν των βιοχημικών τεχνικών, η ταυτοποίηση του *Phdp* μπορεί να διεξαχθεί και με ορολογικές ή βιομοριολογικές δοκιμασίες. Σε αυτά τα πλαίσια, μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων έχει αναπτυχθεί και αξιολογηθεί για την ταυτοποίηση του συγκεκριμένου βιοπαθογόνου, ακόμη και χωρίς προηγούμενη απομόνωση του σε καθαρή καλλιέργεια.

III.1. Ορολογικές τεχνικές

Με δεδομένο ότι τα στελέχη του *Phdp* είναι αντιγονικώς ομοιόμορφα ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης, οι ορολογικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια αξιόπιστη ανίχνευση ή ταυτοποίησή του (Magariños *et al.*, 1996c; Romalde, 2002). Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν δοκιμασίες ανοσοσυγκόλλησης, φθορίζοντος αντισώματος (με μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα), και ανοσο-ενζυμικές δοκιμές (Bakopoulos *et al.*, 1997c; 1997d; Romalde *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2001). Ταχυδιαγνωστικά 'κιτς' έχουν προκύψει από τις ανωτέρω έρευνες και μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν για την ανίχνευση ασυμπτωματικών φορέων του μικροβίου.

III.2. Βιομοριολογικές τεχνικές

Οι Aoki *et al.* (1997) χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) για την ταχεία αναγνώριση του Είδους από το ειδικό πλασμίδιο pZP1. Δεδομένου, όμως, ότι τα δύο υποείδη του *Photobacterium damsela* έχουν πολλές ομοιότητες στο DNA τους, η ακριβής ταυτοποίηση και διάκριση μεταξύ τους είναι αρκετά δύσκολη (Osorio *et al.*, 1999; Romalde, 2002). Παρόλο που και τα δύο υποείδη θεωρούνται ως παθογόνα ψαριών, μόνο το *Phdp* μπορεί να προκαλέσει οξείες λοιμώξεις με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Zappulli *et al.*, 2005). Για τη διάκριση μεταξύ των δύο υποειδών, οι Osorio *et al.* (2000) πρότειναν μια μέθοδο που βασίζεται σε διπλή

PCR, του γονιδίου *ureC* και του 16SrRNA, λόγω της έλλειψης του γονιδίου *ureC* στο *piscicida*, με την διάκριση του υποείδους να βασίζεται σε έμμεση απόδειξη (ήτοι, στην έλλειψη ενισχύσεως του *ureC*). Μια συνδυασμένη προσέγγιση της τεχνικής PCR και της επιμετάλλωσης (plating) προτάθηκε από τους Rajan *et al.* (2003) ως ταχύτερη και μικρότερου κόστους από το «API-20E», ενώ και άλλες μέθοδοι, π.χ. το ribotyping (Magariños *et al.*, 1997), η τεχνική της ανάλυσης τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) (Magariños *et al.*, 2000), και η τεχνική του ενισχυμένου πολυμορφισμού μήκους θραύσματος (AFLP) (Thyssen *et al.*, 2000; Kvitt *et al.*, 2002), φαίνονται κατάλληλες για να διαφοροποιήσουν τα δύο υποείδη. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές απαιτούν εξαγωγή DNA από καθαρές καλλιέργειες και επίσης απαιτούνται τα προφίλ αναφοράς για την αναγνώριση του κάθε στελέχους (Zappulli *et al.*, 2005). Οι τελευταίοι χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR-RFLP που αποδείχθηκε πολύ ευαίσθητη και αξιόπιστη καθώς το *Phdp* δίνει πάντα ένα μοναδικό ξεχωριστό πρότυπο RFLP ακόμη και όταν το *ssp. damsela* είναι επίσης παρόν. Τέλος, πρόσφατα αναπτύχθηκε, από τους Martins *et al.* (2015), μια PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) που βασίζεται σε ειδικούς εκκινητές του γονιδίου *toxR* και επιτρέπει την ταχεία αναγνώριση των δύο υποειδών του *Photobacterium damsela* στο περιβάλλον.

IV. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Αν και γίνεται ευρέως παραδεκτό ότι ο εμβολιασμός είναι ιδανική μέθοδος για την προληπτική αντιμετώπιση των μολυσματικών νοσημάτων των ιχθύων, τα εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια είναι αριθμητικώς περιορισμένα ενώ και χρηστικοί περιορισμοί των μπορούν κατά περίπτωση να ισχύουν (Bakopoulos *et al.*, 2003a; Martinez-Manzanares *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011). Πέραν αυτών των τεχνικών ζητημάτων, οι εμβολιασμοί σε συγκεκριμένους πληθυσμούς δεν μπορούν να εξαλείψουν τους παθογόνους μικρο-οργανισμούς από το περιβάλλον ώστε η εμφάνιση της νόσου σε ανεμβολίαστους ιχθυοπληθυσμούς να είναι πάντοτε πιθανή (Thyssen και Ollevier, 2001). Επομένως, η θεραπευτική παρέμβαση (κατά κανόνα ως χημειοθεραπεία) σε κλινικώς νοσούντες πληθυσμούς παραμένει ως ένα αποτελεσματικό ενδεχόμενο τόσο κατά της φωτοβακτηρίωσης όσο και κατά των άλλων βακτηριογενών ασθενειών (*ibid.*).

IV.1. Χημειοθεραπεία

Μεταξύ των χημειοθεραπευτικών παραγόντων κυρίαρχη θέση εξακολουθούν, βεβαίως, να κατέχουν τα αντιβιοτικά τα οποία συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες και, ενίοτε, αναγκαστικά (Laganà *et al.*, 2011). Οι πρώτες μελέτες για την ευαισθησία του *Phdp* σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες έγιναν στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1970 (αναφ. από Magariños *et al.*, 1996c). Μετέπειτα έχουν διεξαχθεί, σε διεθνή κλίμακα, αρκετές τέτοιες μελέτες με ποικιλία αποτελεσμάτων, αναλόγως και των εκάστοτε δοκιμαζόμενων ουσιών· επίσης, για τη χημειοθεραπεία του *Phdp*, έχουν χρησιμοποιηθεί και διάφοροι άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες (Toranzo *et al.*, 1991; Bakopoulos *et al.*, 1995; Acerete *et al.*, 2009).

Περί τα τέλη της δεκαετίας του 1980 άρχισαν να εμφανίζονται ισχυρές ενδείξεις ανθεκτικότητας του μικροβίου στα αντιβιοτικά όταν αναφέρθηκαν και κρούσματα προκαλούμενα από στελέχη ανθεκτικά στην αμπισιλίνη, τις τετρακυκλίνες, την χλωραμφενικόλη και άλλα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος (Magariños *et al.*, 1996c). Η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα απεδείχθη αργότερα ότι οφείλεται στην οριζόντια μεταφορά σχετικών γονιδίων μέσω γενετικών παραγόντων αντίστασης (del Castillo *et al.*, 2013). Αυτά τα

«πλασμίδια» διαθέτουν όχι μόνο την ικανότητα να αντιγράφονται αλλά, ίσως, και την ικανότητα να διαδίδονται από μόνα τους (del Castillo *et al.*, 2013).

Τα R-πλασμίδια του *Phdp* (π.χ. pPHDP60 ή pP9014), περιέχουν διάφορα γονίδια αντοχής σε ποικίλα φάρμακα υπονομεύοντας, έτσι, την πιθανότητα μιας επιτυχούς χημειοθεραπείας (Balado *et al.*, 2013; del Castillo *et al.*, 2013). Μεταξύ των γονιδίων αυτών, υπάρχουν αυτά που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στην αμπισιλίνη, τη χλωραμφενικόλη, τη φλορφενικόλη, την καναμυσίνη, τα σουλφοναμίδια, τις τετρακυκλίνες, την ερυθρομυσίνη κ.λπ. (Kim και Aoki, 1993; Morii και Ishikawa, 2012). Μεταξύ άλλων, για το συγκεκριμένο βιοπαθογόνο έχουν περιγραφεί δύο μεταφερόμενοι μεγάλοι R-παράγοντες οι οποίοι κωδικοποιούν ανθεκτικότητα σε καναμυσίνη, χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη και σουλφοναμίδες αφ' ενός (ο pP99018) και σε τετρακυκλίνη, τριμεθοπρίμη και σουλφοναμίδη αφ' ετέρου (ο pP91278) και προέρχονται, αντίστοιχα, από την Ιαπωνία και τις Ηνωμένες Πολιτείες (Kim *et al.*, 2008).

Η γεωγραφική διάσταση του φαινομένου είναι ιδιαιτέρως ενδεικτική για το όλον θέμα των χημειοθεραπειών με αντιμικροβιακές ουσίες. Για παράδειγμα, τα στελέχη που έχουν απομονωθεί στην Ιαπωνία είναι ανθεκτικά σε ένα ευρύτερο φάσμα αντιβιοτικών από ό,τι τα ευρωπαϊκά, κάτι που προφανώς αντανακλά στην μακροχρόνια χρήση τέτοιων φαρμάκων για τη θεραπεία της φωτοβακτηρίωσης στην εν λόγω χώρα (Bakoroulios *et al.*, 1995). Εξ άλλου, είναι ήδη γνωστό ότι στην Ιαπωνία η συχνή χρήση διαφόρων φαρμάκων προκάλεσε αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων τα οποία, φυσικά, συνιστούν μια μεγέθυνση της απειλής για σοβαρότερες ζημιές από τις βακτηριογενείς νόσους όπως η φωτοβακτηρίωση (Kawanishi *et al.*, 2006). Σχετικές *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η αμοξισιλίνη, η αμπισιλίνη, η πενισιλίνη, η γενταμυσίνη, η στρεπτομυσίνη, τα ενισχυμένα σουλφοναμίδια και η φλορφενικόλη είναι αρκετά αποτελεσματικοί θεραπευτικοί παράγοντες ενώ, από την άλλη μεριά, έχει παρατηρηθεί σημαντική ανθεκτικότητα σε ουσίες όπως τα νιτροφουράνια, οι τετρακυκλίνες, οι απλές σουλφοναμίδες, οι κινολόνες, η καναμυσίνη και η χλωραμφενικόλη (Kawanishi *et al.*, 2006).

Στην περιοχή της Μεσογείου παρατηρούνται διαφορές από τη μία χώρα στην άλλη ως προς τα διαθέσιμα αντιβιοτικά, ανάλογα με

το νομικό πλαίσιο που ισχύει τοπικά. Στην Ιβηρική, συνήθως χρησιμοποιούνται η χλωραμφενικόλη, οι τετρακυκλίνες, η αμπισιλίνη και η νιτροφουραντοΐνη (Toranzo *et al.*, 1991; Baptista *et al.*, 1996), ενώ στην Ελλάδα η νόσος αντιμετωπίζεται κυρίως με κινολόνες (π.χ. οξολινικό οξύ ή φλουμεκίνη), σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνες (Bakoroulios *et al.*, 1995). Αυτές οι διαφορές αντικατοπτρίζονται, σε κάποιο βαθμό, στη διαφορά ανθεκτικότητας των στελεχών του βιοπαθογόνου τα οποία απομονώνονται τοπικά· σχετικές μελέτες έχουν διεξαχθεί (Thyssen και Ollevier, 2001; Martínez-Manzanares *et al.*, 2008) οι οποίες επιβεβαιώνουν την διαφοροποίηση των αντιστάσεων σε μία ευρεία ποικιλία αντιμικροβιακών ανάλογα με τη χώρα προέλευσης του κάθε στελέχους. Άλλες μελέτες, με ισπανικά στελέχη μόνον, έδειξαν αντίσταση σε μία ευρεία ποικιλία αντιμικροβιακών χημικών ήτοι, χλωραμφενικόλη, γενταμυσίνη, φλουμεκίνη, οξολινικό οξύ, οξυτετρακυκλίνη και τετρακυκλίνη (Toranzo *et al.*, 1991; Balebona *et al.*, 1992; Zorrilla *et al.*, 1999). Στελέχη από την Ιταλία ευρέθησαν ανθεκτικά σε φλουμεκίνη, αμοξυσιλίνη, αμπισιλίνη, καρβενισιλίνη και κεφαλοθίνη, ενώ ήταν ευαίσθητα στη χλωραμφενικόλη, τη νιτροφουραντοΐνη και τη τομπραμυκίνη (Laganà *et al.*, 2011). Τα ελληνικά στελέχη εμφανίζονται πιο ανθεκτικά στις κινολόνες και τις ενισχυμένες σουλφοναμίδες, αλλά όχι και στα νιτροφουράνια και τις τετρακυκλίνες (Bakoroulios *et al.*, 1995).

Το φαινόμενο της εκτεταμένης αντίστασης που δείχνει το *Phdp* στα αντιμικροβιακά είναι επίσης ένα συνδυαστικό αποτέλεσμα της μάλλον ανεξέλεγκτης χρήσης τέτοιων ουσιών προκειμένου για την θεραπεία και άλλων, παρόμοιων, ασθενειών όπως είναι η δονακίωση, η οποία συνήθως εμφανίζεται παράλληλα με τη φωτοβακτηρίωση και συνιστά ένα άλλο μακροχρόνιο πρόβλημα για την ελληνική θαλασσοκαλλιέργεια (Bakoroulios *et al.*, 1995).

Σε γενικές γραμμές συμπεραίνεται ότι, για να είναι η χημειοθεραπεία αποτελεσματική, θα πρέπει κατ' αρχήν να διεξάγονται οι κατάλληλες δοκιμασίες για την αξιολόγηση της ευαισθησίας και της ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους το οποίο ανακύπτει σε τοπικές επιδημίες απέναντι σε διάφορους διαθέσιμους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Martínez-Manzanares *et al.*, 2008). Είναι επίσης πολύ σημαντικό να γίνεται μια εν γένει υπεύθυνη χρήση των αντιβιοτικών στην ιχθυοκαλλιέργεια (Laganà *et al.*, 2011).

Τέλος, είναι γνωστόν ότι, κατά την διάρκεια της μόλυνσης, το *Phdp* είναι ικανό για ενδοκυτταρική επιβίωση σε μακροφάγα το οποίο μπορεί να εξηγήσει την αναποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας η οποία έχει παρατηρηθεί για κάποια ξεσπάσματα της ασθένειας (Kusuda και Salati, 1993; Romalde, 2002). Ως εκ τούτου, καθίσταται φανερό ότι η αναζήτηση εναλλακτικών θεραπειών καθώς και η καλύτερη χρήση της ανοσοπροφύλαξης αντιπροσωπεύουν, πιθανώς, μια καλύτερη εκδοχή για τον έλεγχο της φωτοβακτηρίωσης στο μέλλον (Andreoni και Magnani, 2014).

IV.2. Εναλλακτικές θεραπείες

Σε στέλεχος *Phdp* που απομονώθηκε στην Κίνα έγινε μελέτη με 18 παραδοσιακά χημειοθεραπευτικά και με 28 επιπλέον φάρμακα φυτικής προέλευσης και ευρέθη ότι, πέραν της ευαισθησίας του σε κάποια από τα «κλασσικά» αντιμικροβιακά, ήταν πολύ ευαίσθητο στα *Psidium guajava* και *Atractylodes lancea* με αποτέλεσμα ήδη να θεωρείται πιθανή η χρήση «φυτοβιοτικών» στην ιχθυοκαλλιέργεια (Wang *et al.*, 2013). Ένα ακόμη πιθανό φυτοβιοτικό με ισχυρή δραστηριότητα είναι το σκόρδο καθώς σε μελέτη των Guo *et al.* (2015) βρέθηκε να έχει ανασταλτική δράση κατά του *Phdp* αλλά και κατά του *Streptococcus iniae*· επίσης, ένα σιτηρέσιο που περιείχε σκόνη σκόρδου και χορηγήθηκε επί 28 ημέρες σε δόση 1,2g/kg σωματικού προσέφερε σημαντική προστασία έναντι της φωτοβακτηρίωσης. Οι ιδιότητες αυτές του σκόρδου οφείλονται σε οργανοθειικές ενώσεις και κυρίως την αλλισίνη που έχουν αποδεδειγμένα αντιβακτηριακή δραστηριότητα κατά στελεχών από τα Γένη *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* και *Vibrio* (Guo *et al.*, 2015).

Η θεραπεία με βακτηριοφάγους είναι πολλά υποσχόμενη, θεωρητικά, διότι μειώνει τον κίνδυνο περαιτέρω ανάπτυξης και διάδοσης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών (Nakai και Park, 2002; Pereira *et al.*, 2011). Ειδικότερα, τα πλεονεκτήματα είναι ότι οι φάγοι μπορούν να έχουν συγκεκριμένο στόχο καθώς και περιορισμένο περιβαλλοντικό αντίκτυπο καθιστώντας την θεραπεία πιο ευέλικτη, γρήγορη και, ίσως, πιο φθηνή (Pereira *et al.*, 2011). Επίσης, παρουσιάζει ικανοποιητική αδρανοποίηση των βιοπαθογόνων και αποφυγή της διάδοσης της ασθένειας ενώ, ταυτόχρονα,

ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος ανεπιθύμητων παρενεργειών για τα ψάρια επιτρέποντας, πιθανόν, μια λιγότερο επικίνδυνη επανάληψη της θεραπείας (Nakai και Park, 2002). Επιπλέον, αυτού του τύπου η θεραπευτική προσέγγιση υπόσχεται αυξημένη ασφάλεια δεδομένου ότι οι βακτηριοφάγοι δεν επάγουν την εμφάνιση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Ωστόσο, η επιτυχία της θεραπείας με βακτηριοφάγους εξαρτάται από τη λεπτομερέστερη κατανόηση της χρονικής δυναμικής των περισσότερων παθογόνων (Pereira *et al.*, 2011).

Τέλος, στην μελέτη των Tsai *et al.* (2015), διερευνήθηκε η αντίδραση του *Phdp* στην παρουσία κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMP): πρόκειται για νέα συνθετικά AMP που σχεδιάστηκαν και εμφάνισαν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση κατά του παθογόνου και είναι πλέον υποψήφιοι αντιμικροβιακοί παράγοντες για την θεραπεία της ασθένειας αλλά, μάλλον, σε περιορισμένη κλίμακα εφαρμογής.

V. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Με δεδομένο ότι η χημειοθεραπεία δεν είναι πάντοτε αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης (Toranzo *et al.*, 1991) ενώ ακόμα και οι εμβολιασμοί μπορεί να παρουσιάζουν προβλήματα καθώς και ζητήματα οικονομίας (Magariños *et al.*, 1999), η πρόληψη μέσω της υγιεινής είναι σαφώς ο βασικότερος τρόπος για τον έλεγχο όλων των μεταδοτικών νοσημάτων ώστε να διατηρηθεί βιώσιμη μια επιχείρηση ιχθυοκαλλιέργειας (Gudding και Van Muiswinkel, 2013). Η επιτυχής τήρηση των υγειονομικών όρων σε μια εκτροφή κατά κάποιου συγκεκριμένου βιοπαθογόνου πρέπει να λαμβάνει υπόψη, κατ' αρχάς, τους τρόπους μετάδοσης, λ.χ. του *Phdp*, ώστε να εφαρμόζονται όλα τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή νόσησης τόσο από την πλευρά των ψαριών όσο και από αυτήν του αμέσου περιβάλλοντός τους· συγκεκριμένα, να μην γίνεται σίτιση με τροφές ύποπτης προέλευσης, να αποφεύγονται οι χειρισμοί και η υψηλή ιχθυοφόρτιση όταν η θερμοκρασία είναι σε άνοδο, και να μην εισάγονται ψάρια από περιοχές όπου ενδημεί η νόσος (Magariños *et al.*, 2001)· εναλλακτικά, να υπάρχει πιστοποίηση για την μη ύπαρξη υγιών φορέων του μικροβίου (Μπακόπουλος, 2010). Πέρα από τα απλά μέτρα αποφυγής εισαγωγής ή διέγερσης της νόσου, μπορούν να λαμβάνονται και πιο ενεργητικά μέτρα πρόληψης ήτοι, χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής, προβιοτικών, ή ειδικών ανοσοενισχυτικών σκευασμάτων (*ibid.*).

V.1. Γενετική αντίσταση

Η επιλογή και αναπαραγωγή ατόμων γενετικά ανθεκτικών στη φωτοβακτηρίωση είναι ένας άλλος πιθανός τρόπος για να ελαττωθεί η πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας με την συνακόλουθη μείωση των απωλειών στους εκτρεφόμενους ιχθυοπληθυσμούς (Massault *et al.*, 2011). Η διαδοχική επιλογή γεννητόρων με εγγενή αντοχή στην νόσο μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική ελάττωση της πιθανότητας προσβολής ενώ, επιπλέον, ελαττώνεται και η πιθανότητα διάδοσης στον πληθυσμό και, άρα, ο κίνδυνος μόλυνσης για τα πιο ευπαθή άτομα (Antonello *et al.*, 2009). Σε πειράματα με τσιπούρα παρατηρήθηκε (*ibid.*) γενετική ανθεκτικότητα κατά της φωτοβακτηρίωσης καθώς και μια θετική συσχέτιση μεταξύ του μήκους του σώματος και της επιβίωσης στην νόσο. Η επιλογή για αυξημένο μήκος του σώματος είναι σχετικά απλή και η επιλεκτική

αναπαραγωγή για γενετική προδιάθεση αντίστασης θα μπορούσε να υποβοηθηθεί σημαντικά με τη συμβολή τέτοιων δεικτών επιλογής (Antonello *et al.*, 2009). Στην ίδια αρχή βασίζεται και η χαρτογράφηση ποσοτικών γονοτυπικών χαρακτηριστικών η οποία εφαρμόζεται για τον εντοπισμό περιοχών του γονιδιώματος που σχετίζονται με την αντίσταση σε μια ασθένεια (Andreoni και Magnani, 2014). Στη μελέτη των Massault *et al.* (2011) χρησιμοποιήθηκε η χαρτογράφηση των QTL (quantitative trait loci) σε τσιπούρα για την ανίχνευση τυχόν γονοτυπικής αντίστασης στη φωτοβακτηρίωση· αναγνωρίστηκαν δύο σημαντικοί QTL για ανθεκτικότητα στην ασθένεια, ο πρώτος επηρεάζει την μακροπρόθεσμη επιβίωση (ήτοι, έως την 15^η μέρα μετά την μόλυνση) και ο άλλος τη συνολική επιβίωση και επισημάνθηκε ένας γενετικός δείκτης (ο Id13) που πιθανώς συνδέεται με την ανθεκτικότητα στην ασθένεια.

V.2. Συμπληρώματα διατροφής

Η άμεση ή έμμεση ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι σημαντική για την πρόληψη όλων των μολυσματικών ασθενειών. Για παράδειγμα, μετά την χορήγηση διατροφικών συμπληρωμάτων τρυπτοφάνης και μεθειονίνης σε λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) ευρέθη ότι η μεθειονίνη είχε μια ισχυρή επίδραση στην ανοσοαντίδραση επηρεάζοντας θετικά ανοσολογικούς δείκτες όπως η περιφερειακή λευκοκυτταρική παρουσία, η δραστηριότητα του συμπληρώματος και η βακτηριοκτόνος δράση των φαγοκυττάρων (Machado *et al.*, 2015).

Μια άλλη μέθοδος πρόληψης είναι η χορήγηση ανοσοενισχυτικών όπως είναι οι β-γλυκάνες που έχει αποδειχθεί ότι προσφέρουν προστασία κατά της φωτοβακτηρίωσης (Couso *et al.*, 2003). Οι β-γλυκάνες είναι φυσικοί πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων και μπορούν να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των φαγοκυττάρων και των άλλων στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο σε ψάρια όσο και σε θηλαστικά. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Noya *et al.* (1995b) παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση ενός ειδικού μίγματος τέτοιων ουσιών (διά του στόματος ή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση) αύξησε την φαγοκυττάρωση και, πιθανότατα, την αντίσταση της τσιπούρας στην φωτοβακτηρίωση. Παρομοίως, οι Couso *et al.* (2003) έδειξαν ότι σιτηρέσια με υψηλή περιεκτικότητα β-γλυκανών παρείχαν υψηλότερη

αντίσταση στο παθογόνο σε σύγκριση με άλλα χαμηλής περιεκτικότητας, μετά από χορήγηση 2 εβδομάδων, αλλά είχαν αντίθετο αποτέλεσμα όταν οι γλυκάνες χορηγήθηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα· στην τελευταία περίπτωση, οι χαμηλότερες περιεκτικότητες ήταν αυτές που προκάλεσαν αύξηση στην αντίσταση κατά της φωτοβακτηρίωσης ενώ οι ψηλότερες είχαν αρνητική επίδραση. Για το λόγο αυτό, η χορήγηση υψηλών δόσεων γλυκανών θεωρείται ως λίαν σκόπιμη για την ενίσχυση της αντίστασης των ψαριών σε σύντομες χρονικές περιόδους, για παράδειγμα, πριν μετακινηθούν (Couso *et al.*, 2003).

V.3. Προβιοτικά

Η χορήγηση προβιοτικών μέσω της τροφής ενισχύει την εν γένει άμυνα του οργανισμού κατά βιοπαθογόνων συντελεστών και είναι πλέον ευρέως αποδεκτή στις ιχθυοκαλλιέργειες (de la Banda *et al.*, 2010). Προκειμένου για την πρόληψη της φωτοβακτηρίωσης (καθώς και άλλων βακτηριακών ιχθυοπαθογόνων), οι περισσότερες μελέτες για επιλογή των καταλληλότερων μικρο-οργανισμών για αυτόν τον ρόλο έχουν επικεντρωθεί σε *in vitro* δοκιμές ανταγωνισμού με τα παθογόνα, ενώ υπάρχουν και μελέτες που εστιάζουν στην ενίσχυση των μηχανισμών άμυνας των ψαριών *in vivo* (Díaz-Rosales *et al.*, 2006b; 2009; Salinas *et al.*, 2006; Nayak, 2010). Τα πιο συνήθη προβιοτικά που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι από τα Γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, και *Saccharomyces* (Nayak, 2010).

V.4. Εμβολιασμός

Όλα τα παραπάνω είναι εφαρμόσιμα για πολλές ασθένειες και συνιστούν περισσότερο ή λιγότερο καλές πρακτικές πρόληψης. Εν τούτοις, τα εξειδικευμένα μέτρα ανοσοπροφύλαξης είναι ο πλέον ισχυρός και αξιόπιστος τρόπος για την επίτευξη του ίδιου στόχου. Επομένως, η ανοσοπροφύλαξη έχει ήδη μια σημαντική συμβολή στην επιτυχημένη ανάπτυξη του κλάδου των ιχθυοκαλλιεργειών (Gudding και Van Muiswinkel, 2013).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν διεξαχθεί πάμπολλες μελέτες σχετικά με την ανοσοποίηση κατά της φωτοβακτηρίωσης με αποτέλεσμα αρκετά εμπορικά εμβόλια κατά του *Phdp* να είναι

διαθέσιμα και των οποίων η απόδοση, βέβαια, εξαρτάται από το είδος και την κατάσταση των εμβολιαζομένων ψαριών καθώς και από την σύσταση και τον τρόπο χορήγησης του κάθε σκευάσματος (Magariños *et al.*, 1996c). Τα περισσότερα εμβόλια που δοκιμάστηκαν πειραματικά αποτελούνταν από βακτηριακά κύτταρα θανατωμένα με θερμότητα ή με φορμαλδεΰδη (Magariños *et al.*, 1994c; Bakoroulos *et al.*, 1997e; Acosta *et al.*, 2005). Αν και επαρκής προστασία επετεύχθη με αρκετά από αυτά τα παρασκευάσματα, τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντοτε πολύ ενθαρρυντικά (Kusuda και Salati, 1993). Καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με χρήση σκευασμάτων που βασιζόνταν σε λιποσακχαριδικά αντιγόνα από το κυτταρικό τοίχωμα, τα εξωκυτταρικά προϊόντα ή, ακόμα, και με ζωντανά εξασθενημένα βακτήρια (Kusuda και Hamaguchi, 1988; Magariños *et al.*, 1994c; Romalde, 2002).

Μεταξύ άλλων, οι Bakoroulos *et al.* (2003b) καλλιέργησαν στελέχη του *Phdp* σε διάφορα μέσα που προσομοιάζαν στις *in vivo* συνθήκες και ανέλυσαν τα αντιγόνα από τα κύτταρα, τα εξωκυτταρικά προϊόντα και τον καψικό πολυσακχαρίτη. Ορισμένα θρεπτικά μέσα προκάλεσαν τη σύνθεση νέων πρωτεϊνικών συστατικών τα οποία έδειξαν θετική αντίδραση σε ορό λαβρακιού που λήφθηκε ύστερα από ένα φυσικό ξέσπασμα φωτοβακτηρίωσης πράγμα που υποδηλώνει ότι τα αντιγόνα αυτά συντίθενται στην φύση κατά την διάρκεια της λοίμωξης και έχουν αντιγονική δράση για το λαβράκι. Τέτοια αποτελέσματα θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων εμβολίων. Πέραν των ανωτέρω, οι Bakoroulos *et al.* (2003a) συνέκριναν ένα μίγμα αδρανοποιημένων κυττάρων και εξωκυτταρικών προϊόντων με ένα εμπορικό εμβόλιο πραγματοποιώντας μια σειρά πειραματικών εμβολιασμών σε λαβράκια βάρους 2gr ή 20g μέσω τριών τεχνικών εμβολιασμού (εμβάπτιση, ενδοπεριτοναϊκή έγχυση και δια στόματος χορήγηση). Τα μικρά ψάρια έδειξαν σημαντικά υψηλότερη ποσοστιαία σχετική επιβίωση τόσο στις 6 όσο και στις 12 εβδομάδες μετά την εμβάπτιση, σε σύγκριση με το εμπορικό εμβόλιο (Bakoroulos *et al.*, 2003a). Μάλιστα, η προστασία αυτή διατηρήθηκε μέχρι και τρεις μήνες μετά τον εμβολιασμό με ποσοστό σχετικής επιβίωσης (RPS) 70%. Ωστόσο, η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση δεν τους παρείχε καμία προστασία, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο μη ανεπτυγμένο ανοσοποιητικό τους

σύστημα. Αντίθετα, στα μεγαλύτερα ψάρια επιτεύχθηκαν ποσοστά επιβίωσης μεγαλύτερα από 90%, σε σύγκριση με το εμπορικό εμβόλιο το οποίο έφτασε μόνο έως το 26%. Η χαμηλότερη προστασία καταγράφηκε στη δια στόματος χορήγηση, κάτι που υποδηλώνει ότι δεν αποτελεί μέθοδο αποδεκτή για τον εναρκτήριο εμβολιασμό. Σε άλλη μελέτη που έγινε με λαβράκια (αναφ. σε Barnes *et al.*, 2005), προέκυψε μια επίσης υψηλή προστασία κατόπιν εμβάπτισης σε εναιώρημα αδρανοποιημένων κυττάρων λόγω πρόκλησης ανοσοαντίδρασης αντισωμάτων στους βλεννογόνους ώστε να παρεμποδίζεται η είσοδος του παθογόνου· η αντίδραση βρέθηκε να κατευθύνεται προς πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και των εξωκυτταρικών προϊόντων.

Σε ό,τι αφορά στο Ιαπωνικό μαγιάτικο (*Seriola quinqueradiata*, Temminck & Schlegel), έχει αναφερθεί (Gravning *et al.*, 2007) ότι σημαντική προστασία κατά της φωτοβακτηρίωσης έχει επιτευχθεί με ένα ελαιούχο εμβόλιο, το οποίο προσφέρει επίσης προστασία διάρκειας τουλάχιστον 4 μηνών. Τα εμβολιασμένα ψάρια έδειξαν υψηλούς τίτλους κυκλοφορούντων αντισωμάτων καθώς και αυξημένη κυτταροφαγική δραστηριότητα και αυξημένη παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου τα οποία σημαίνουν ότι το εμβόλιο επήγε την συστηματική ανοσοαντίδραση μέσω εξειδικευμένων αλλά και ανειδίκευτων μηχανισμών λόγω της συνεχούς διέγερσης που προκαλείται με την διαρκή απελευθέρωση των αντιγόνων.

Μια άλλη προσέγγιση στον σχεδιασμό και την παραγωγή αξιόπιστων εμβολιακών σκευασμάτων είναι η αξιοποίηση αυξοτροφικών στελεχών και, ιδιαίτερα, εκείνων με διακοπή στην σικιμική (shikimic) οδό για βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων (φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης). Οι Thune *et al.* (2003) μελέτησαν μια μετάλλαξη του *aroA* από το *Phdp* ως ζωντανό εξασθενημένο εμβόλιο· το μεταλλαγμένο στέλεχος, αν και εξασθενημένο, διατήρησε την ικανότητα να εισβάλει σε υβριδικά αμερικάνικα λαβράκια και μάλιστα, ύστερα από σύντομη εμβάπτιση, πρόσφερε προστασία σε μετέπειτα έκθεση σε παθογόνο στέλεχος του *Phdp*.

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και άλλες βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις αρχίζουν να βρίσκουν εφαρμογή και στις ιχθυοκαλλιέργειες. Τα εμβόλια υπομονάδων έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για ιογενείς ασθένειες, ενώ για τις

βακτηριογενείς είναι πιο δύσκολο να αναπτυχθούν καθώς το βακτηριακό γονιδίωμα είναι πιο πολύπλοκο, με πολυάριθμα πιθανά αντιγόνα, κάτι που οδηγεί σε μια μακρά και επίπονη διαδικασία επιλογής. Η ανάπτυξη της αντίστροφης εμβολιολογίας αποτελεί μια νέα μέθοδο για την ταχεία αναγνώριση των ανοσοδραστικών πρωτεϊνών και έχει εφαρμοστεί για την έρευνα και την ανάπτυξη νέων εμβολίων. Έτσι, οι Ho *et al.* (2011) ανέπτυξαν ένα εμβόλιο υπομονάδων κατά του *Phdp* σε *Rachycentron canadum* (L.) (κοινώς, cobia)· συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκαν τρεις πρωτεΐνες (οι rHSP60, rENOLASE και rGAPDH) οι οποίες προκάλεσαν περισσότερα ειδικά αντισώματα και ισχυρότερη ανοσία όταν χορηγήθηκαν στα ψάρια (Ho *et al.*, 2011). Οι Andreoni *et al.* (2013) επίσης εφάρμοσαν μια βιοτεχνολογική προσέγγιση βασισμένη στην αντίστροφη εμβολιολογία για την παρασκευή ενός εμβολίου κατά της φωτοβακτηρίωσης· ερευνήθηκε μια λιποπρωτεΐνη που εμπλέκεται στην προσκόλληση του βακτηρίου στα επιθηλιακά κύτταρα (η PDP0080) για να εκτιμηθεί η ικανότητά της να προστατεύει το λαβράκι ενάντια στη μόλυνση από *Phdp*. Τα *in vitro* αποτελέσματα έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με PDP 0080 προκάλεσε την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων και υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης ενώ, *in vivo*, η μακρά παραμονή των αντιλιποπρωτεϊνικών αντισωμάτων επιτεύχθηκε με μία μόνη χορήγηση του αντιγόνου. Έτσι, η PDP0080 υπόσχεται καλά αποτελέσματα με την παρασκευή ενός ανασυνδυασμένου εμβολίου κατά της φωτοβακτηρίωσης.

V.4.1. Στρατηγικές Εμβολιασμού

Τα πιο πολλά κρούσματα φωτοβακτηρίωσης στην τσιπούρα παρατηρούνται συνήθως σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των ιχθύων και σε νεαρά άτομα, έως τα 30g περίπου. Επομένως, ένα πρόγραμμα εμβολιασμού που περιλαμβάνει μια πρώτη ανοσοποίηση στα προνυμφικά στάδια, ακόμα και των 50 ημερών, και έναν επαναληπτικό εμβολιασμό, όταν τα ιχθύδια φτάσουν σε μέγεθος 1-2g, βοηθά στην αποφυγή οικονομικών απωλειών στον γόνο (Magariños *et al.*, 1999). Διάφορες πειραματικές δοκιμές εμβολιασμού σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης, απέδειξαν ότι η ανοσοπροφύλαξη μπορεί να είναι αποτελεσματική για την προστασία από το *Phdp* (Magariños *et al.*, 1994c; 1999; Hanif *et al.*, 2005). Γενικά, αν τα ψάρια εμβολιαστούν πολύ νωρίς, η περίοδος προστασίας θα είναι μικρή και θα χρειαστεί επαναληπτικός

εμβολιασμός μετά από ένα μήνα περίπου· επίσης, αν η ασθένεια επανακάμψει κατά τη διάρκεια της εκτροφής, θα είναι απαραίτητος ένας ακόμα εμβολιασμός όταν τα ψάρια γίνουν 30-50g (Gudding *et al.*, 2014). Από την άλλη πλευρά, οι προνύμφες δεν έχουν τη δυνατότητα να αναπτύξουν ειδική ανοσία και, άρα, βασίζονται στην παθητική μεταφορά ανοσίας από τους γεννήτορες. Οι Hanif *et al.* (2004) ανοσοποίησαν γεννήτορες τσιπούρας κατά τα τελευταία στάδια ωρίμανσης των ωοθηκών και μέτρησαν υψηλότερες τιμές από διάφορες χυμικές ανοσολογικές παραμέτρους σε αυγά και προνύμφες προερχόμενες από ανοσοποιημένους γεννήτορες σε σύγκριση με τις τιμές από μη ανοσοποιημένους, υποδεικνύοντας τη μεταφορά ειδικών και μη ειδικών ανοσοποιητικών παραγόντων από τους γεννήτορες. Εν συνεχεία, οι Hanif *et al.* (2005) διερεύνησαν την προστασία σε προνύμφες που προέρχονται από εμβολιασμένους γεννήτορες καθώς και σε προνύμφες που εμβολιάστηκαν με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι οι εμβολιασμοί μπορούν να παράσχουν αξιόπιστη προστασία σε πολλές ιχθυοκαλλιεργητικές περιπτώσεις ενάντια στο *Phdp* με την προϋπόθεση ότι η ανάπτυξη και η εφαρμογή των εμβολίων γίνεται ορθά και μελετημένα. Για παράδειγμα, μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική προστασία σε τσιπούρα και σε λαβράκι από τη φωτοβακτηρίωση με βακτηρίνη εμπλουτισμένη με εξωκυτταρικά προϊόντα κάνοντας την πρώτη ανοσοποίηση με εμβάπτιση στο στάδιο της προνύμφης, ένα δεύτερο εμβολιασμό σε πολύ νεαρά ιχθύδια, ακολουθούμενο από ένα ακόμα επαναληπτικό εμβολιασμό (ή χορήγηση δια του στόματος) στο στάδιο της προχωρημένης εκτροφής (Bakopoulos *et al.*, 2003a; Gudding *et al.*, 2014). Επισημαίνεται, ωστόσο, ότι προκειμένου για τέτοια προγράμματα εμβολιασμών στην πράξη, θα πρέπει να υπάρχει επαρκής φαινοτυπική, ορολογική και γενετική ομοιογένεια στα υπό χρήση στελέχη του *Phdp* (Toranzo *et al.*, 1991; Magariños *et al.*, 1992b) καθώς, επίσης, να είναι η σύσταση των εξωκυτταρικών προϊόντων η πλέον κατάλληλη για το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα (Magariños *et al.*, 1992a; 1994c).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αθανασοπούλου, Φ. (2006). *Νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα*. Διδακτικές Σημειώσεις του μαθήματος Ιχθυοπαθολογίας. Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μπακόπουλος, Β. (2010). *Ασθένειες των Ιχθύων*. Διδακτικές Σημειώσεις μαθήματος. Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου.

Παπουτσόγλου, Σ. (1997). *Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες*. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.

Φώτης, Γ., Αγγελίδης, Π. (2003). *Εκτροφή και Παθολογία ιχθύων*. Τόμος Α', Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη. σσ.306-313.

Acerete, L., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L. (2009). *Physiological response of hybrid striped bass subjected to Photobacterium damsela subsp. piscicida*. *Aquaculture*, 298(1): 16-23.

Acosta, F., Real, F., de Galarreta, C.R., Díaz, R., Padilla, D., Ellis, A.E. (2003). *Toxicity of nitric oxide and peroxy nitrite to Photobacterium damsela subsp. piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(3): 241-248.

Acosta, F., Real, F., Ellis, A.E., Tabraue, C., Padilla, D., de Galarreta, C.R. (2005). *Influence of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection with Photobacterium damsela subsp. piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 18(1): 31-38.

Acosta, F., Ellis, A.E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J., Real, F. (2006). *Complement consumption by Photobacterium damsela subsp. piscicida in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(5): 709-717.

Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V., Real, F. (2009). *Invasion and survival of Photobacterium damsela subsp. piscicida in non-phagocytic cells of gilthead seabream, Sparus aurata L.* *Journal of Fish Diseases*, 32(6): 535-541.

Amagliani, G., Omiccioli, E., Andreoni, F., Boiani, R., Bianconi, I., Zaccone, R., Mancuso, M., Magnani, M. (2009). *Development of a multiplex PCR assay for Photobacterium damsela subsp. piscicida identification in fish samples*. Journal of Fish Diseases, 32(8): 645-653.

Andreoni, F., Boiani, R., Serafini, G., Amagliani, G., Dominici, S., Riccioni, G., Zaccone, R., Mancuso, M., Scapigliati, G., Magnani, M. (2013). *Isolation of a novel gene from Photobacterium damsela subsp. piscicida and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate*. Vaccine, 31(5): 820-826.

Andreoni, F., Magnani, M., (2014). *Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis*. Journal of Immunology Research, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/793817>.

Antonello, J., Massault, C., Franch, R., Haley, C., Pellizzari, C., Bovo, G., Patarnello, T., de Koning, D.J., Bargelloni, L. (2009). *Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (Sparus aurata L.)*. Aquaculture, 298(1): 29-35.

Aoki, T., Ikeda, D., Katagiri, T., Hirono, I. (1997). *Rapid detection of the fish-pathogenic bacterium Pasteurella piscicida by polymerase chain reaction targetting nucleotide sequences of the species-specific plasmid pZP1*. Fish Pathology, 32(3): 143-151.

Arijo, S., Borrego, J.J., Zorilla, I., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. (1998). *Role of the capsule of Photobacterium damsela subsp. piscicida in protection against phagocytosis and killing by gilt-head seabream (Sparus aurata, L.) macrophages*. Fish & Shellfish Immunology, 8(1): 63-72.

Austin, B., Austin, D.A. (2007). *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*. Springer Science & Business Media.

Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., (1995). *Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of Pasteurella piscicida isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy*. Journal of Fish Diseases, 18(1): 1-7.

Bakopoulos, V., Peric, Z., Rodger, H., Adams, A., Richards, R., (1997a). *First report of fish pasteurellosis from Malta*. Journal of Aquatic Animal Health, 9(1): 26-33.

Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R. H. (1997b). *The effect of iron limitation growth conditions on the cell and extracellular components of the fish pathogen Pasteurella piscicida*. Journal of Fish Diseases, 20(4): 297-305.

Bakopoulos, V., Volpatti, D., Papapanagiotou, E., Richards, R., Galeotti, M., Adams, A. (1997c). *Development of an ELISA to detect Pasteurella piscicida in culture and in 'spiked' fish tissue*. Aquaculture, 156(3): 359-366.

Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H. (1997d). *Production and characterization of monoclonal antibodies against Pasteurella piscicida, the causative agent of fish pasteurellosis*. Journal of Fish Diseases, 20(4): 307-315.

Bakopoulos, V., Volpatti, D., Adams, A., Galeotti, M., Richards, R. (1997e). *Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass Dicentrarchus labrax, L. to Photobacterium damsela subsp. piscicida, the causative agent of fish Pasteurellosis*. Fish & Shellfish Immunology, 7(3): 161-174.

Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A., Dimitriadis, G.J. (2003a). *Vaccination trials of sea bass, Dicentrarchus labrax (L.), against Photobacterium damsela subsp. piscicida, using novel vaccine mixtures*. Journal of Fish Diseases, 26(2): 77-90.

Bakopoulos, V., Pearson, M., Volpatti, D., Gousmani, L., Adams, A., Galeotti, M., Dimitriadis, G.J. (2003b). *Investigation of media formulations promoting differential antigen expression by Photobacterium damsela ssp. piscicida and recognition by sea bass, Dicentrarchus labrax (L.), immune sera*. Journal of Fish Diseases, 26(1): 1-13.

Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A., Dimitriadis, G.J. (2004). *The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Journal of Fish Diseases, 27(1): 1-13.

Balado, M., Lemos, M.L., Osorio, C.R. (2013). *Genetic characterization of pPHDP60, a novel conjugative plasmid from the marine fish pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Plasmid, 70(1), 154-159.

Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Sedano, J., Martínez-Mazanares, E., Vidaurreta, A., Borrego, J.J., Toranzo, A.E. (1992). *Isolation of Pasteurella piscicida from sea bass in southwestern Spain*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 12: 1-3.

Baptista, T., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., (1996). *First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (Sparus aurata)*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 16: 92-95.

Barnes, A.C., dos Santos, N.M.S., Ellis, A.E. (2005). *Update on bacterial Vaccines: Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Developments in Biologicals, Basel, 121: 75-84.

Baudin-Laurencin, F., Pepin, J.F., Raymond, J.C. (1991). *First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts*. In: 5th International Conference of the European Association of Fish Pathologists (p. 17).

Botella, S., Pujalte, M J., Macián, M.C., Ferrús, M.A., Hernández, J., Garay, E. (2002). *Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of Photobacterium damsela subsp. damsela*. Journal of Applied Microbiology, 93(4): 681-688.

Bullock, G.L. (1978). *Pasteurellosis of fishes*. US Fish & Wildlife Publications, Paper 126.

Candan, A., Ang Kucker, M., Karatas, S. (1996). *Pasteurellosis in cultured sea bass (Dicentrarchus labrax) in Turkey*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 16: 150-153.

Ceschia, G., Quaglio, F., Giorgetti, G., Bertoja, G., Bovo, G. (1991). *Serious outbreak of pasteurellosis (Pasteurella piscicida) in euryhaline species along the Italian coasts*. In Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathology (p. 26).

Christofilogiannis, P., (2011). *Greek Mariculture 2011: 30 years of experience the cornerstone for building the vision for 2030*. Aquaculture Europe, 36 (2).

Couso, N., Castro, R., Magariños, B., Obach, A., Lamas, J. (2003). *Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis*. Aquaculture, 219(1): 99-109.

Dalla Valle, L., Zanella, L., Belvedere, P., Colombo, L. (2002). *Use of random amplification to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, Photobacterium damsela subsp. piscicida (Vibrionaceae)*. Aquaculture, 207(3): 187-202.

de La Banda, I.G., Lobo, C., León-Rubio, J.M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L.M., Linares, F., Arce, F., Arijo, S. (2010). *Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (Solea senegalensis, Kaup 1858) performance and protection against Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Aquaculture, 306(1): 281-288.

del Castillo, C.S., Jang, H.B., Hikima, J.I., Jung, T.S., Morii, H., Hirono, I., Kondoc, H., Kurosaka, C., Aoki, T. (2013). *Comparative analysis and distribution of pP9014, a novel drug resistance IncP-1 plasmid from Photobacterium damsela subsp. piscicida*. International Journal of Antimicrobial Agents, 42(1): 10-18.

Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Arijo, S., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M.A., Balebona, M.C. (2006a). *Superoxide dismutase and catalase activities in Photobacterium damsela ssp. piscicida*. Journal of Fish Diseases, 29(6): 355-364.

Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodríguez, A., Cuesta, A., Chabrillón, M., Balebona, M.C., Meseguer, J. (2006b). *Gilthead seabream (Sparus aurata L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics*. Fish & Shellfish Immunology, 20(4), 482-492.

Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrillón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M.A. (2009). *Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (Solea senegalensis, Kaup) phagocytes, and protection against Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Aquaculture, 293(1), 16-21.

do Vale, A., Afonso, A., Silva, M.T. (2002). *The professional phagocytes of sea bass (Dicentrarchus labrax L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity*. Fish & Shellfish Immunology, 13(3): 183-198.

do Vale, A., Marques, F., Silva, M.T. (2003). *Apoptosis of sea bass (Dicentrarchus labrax L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Fish & Shellfish Immunology, 15(2): 129-144.

do Vale, A., Silva, M.T., dos Santos, N., Nascimento, D.S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C. Ellis, E.E., Azevedo, J.E. (2005). *AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of Photobacterium damsela subsp. piscicida with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils*. Molecular Microbiology, 58(4): 1025-1038.

European Commission, (2012a). *Seabass*. FISHERIES AND AQUACULTURE IN EUROPE. No 57. http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheet_s-aquaculture-species/seabass_en.pdf.

European Commission, (2012b). *Sea bream*. FISHERIES AND AQUACULTURE IN EUROPE. No 59. http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheet_s-aquaculture-species/sea-bream_en.pdf.

FAO, (2006). *State of world aquaculture*. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Rome, Italy.

FAO (2009). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2009*. Rome 2009. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>.

FAO (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Rome 2012. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>.

FISHSTAT & FEAP (2008). <http://www.feap.info/FileLibrary%5C11%5CProductionreport2008.pdf>.

Gravningen, K., Sakai, M., Mishiba, T., Fujimoto, T. (2008). *The efficacy and safety of an oil-based vaccine against Photobacterium damsela subsp. piscicida in yellowtail (Seriola quinqueradiata): A field study*. Fish & Shellfish Immunology, 24(5), 523-529.

Gudding, R., Van Muiswinkel, W.B. (2013). *A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture*. Fish & Shellfish Immunology, 35(6): 1683-1688.

Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, O. (Eds.). (2014). *Fish Vaccination*. John Wiley & Sons.

Guo, J.J., Kuo, C.M., Hong, J.W., Chou, R.L., Lee, Y.H., Chen, T.I. (2015). *The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against Photobacterium damsela subsp. piscicida and Streptococcus iniae and on growth in Cobia, Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 435: 111-115.

Hanif, A., Bakopoulos, V., Dimitriadis, G.J. (2004). *Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (Sparus aurata) larvae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(5): 411-435.

Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., Dimitriadis, G.J. (2005). *The effect of sea bream (Sparus aurata) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by Photobacterium damsela subsp. piscicida and on the humoral immune parameters*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(4): 345-361.

Hawke, J.P., (2012). 1.2.14 *Photobacteriosis*. <http://afs-fhs.org/perch/resources/1.2.14-photobacteriosis2014.pdf>.

Ho, L.P., Lin, J.H.Y., Liu, H.C., Chen, H.E., Chen, T.Y., Yang, H.L. (2011). *Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against Photobacterium damsela ssp. piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1): 412-419.

Janssen, W.A., Surgalla, M.J., (1968). *Morphology, physiology, and serology of a Pasteurella species pathogenic for white perch (Roccus americanus)*. *Journal of Bacteriology*, 96(5): 1606-1610.

Jung, T.S., Thompson, K.D., Morris, D.J., Adams, A., Sneddon, K. (2001). *The production and characterization of monoclonal antibodies against Photobacterium damsela ssp. piscicida and initial observations using immunohistochemistry*. *Journal of Fish Diseases*, 24(2): 67-77.

Kawanishi, M., Kijima, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Yagyū, K., Takahashi, T., Suzuki, S., Tamura, Y. (2006). *Drug resistance and random amplified polymorphic DNA analysis of Photobacterium damsela ssp. piscicida isolates from cultured Seriola (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(6), 648-653.

Kim, E.H., Aoki, T. (1993). *Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of Pasteurella piscicida isolated from cultured yellowtail in Japan*. Microbiology and Immunology, 37(2): 103-109.

Kim, M.J., Hirono, I., Kurokawa, K., Maki, T., Hawke, J., Kondo, H., Santos, M.D., Aoki, T. (2008). *Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from Photobacterium damsela subsp. piscicida isolates collected in Japan and the United States*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(2): 606-611.

Kubota, S.S., Kimura, M., Egusa, S. (1970). *Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail. I. Symptomatology and histopathology*. Fish Pathology, 4(1): 11-18.

Kusuda, R., Matsui, T., Kawai, K., (1978). *Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with Pasteurella piscicida as the causative agent, 2: On the serological properties [marine fish]*. Fish Pathology 13(2): 79-83.

Kusuda, R., Hamaguchi, M. (1988). *The efficacy of attenuated live bacterin of Pasteurella piscicida against pseudotuberculosis in yellowtail*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 8(3): 50.

Kusuda, R., Salati, F., (1993). *Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan*. Annual Review of Fish Diseases, 3: 69-85.

Kvitt, H., Ucko, M., Colorni, A., Batargias, C., Zlotkin, A., Knibb, W., (2002). *Photobacterium damsela ssp. piscicida: detection by direct amplification of 16S rRNA gene sequences and genotypic variation as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP)*. Diseases of Aquatic Organisms, 48(3): 187-195.

Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zacccone, R., Delia, S. (2011). *Susceptibility to antibiotics of Vibrio spp. and Photobacterium damsela ssp. piscicida strains isolated from Italian aquaculture farms*. New Microbiologica, 34(1): 53-63.

Machado, M., Azeredo, R., Díaz-Rosales, P., Afonso, A., Peres, H., Oliva-Teles, A., Costas, B. (2015). *Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (Dicentrarchus labrax) immune status and inflammatory response*. Fish & Shellfish Immunology, 42(2): 353-362.

Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1992a). *Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen Pasteurella piscicida*. Journal of General Microbiology, 138(12): 2491-2498.

Magariños, B., Romalde, J.L., Bandin, I., Fouz, B., Toranzo, A.E. (1992b). *Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of Pasteurella piscicida strains isolated from fish*. Applied and Environmental Microbiology, 58(10): 3316-3322.

Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1994a). *Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen Pasteurella piscicida in seawater and sediment*. Applied and Environmental Microbiology 60: 180–186.

Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1994b). *Iron uptake by Pasteurella piscicida and its role in pathogenicity for fish*. Applied and Environmental Microbiology, 60(8): 2990-2998.

Magariños, B., Romalde, J.L., Santos, Y., Casal, J.F., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1994c). *Vaccination trials on gilthead seabream (Sparus aurata) against Pasteurella piscicida*. Aquaculture, 120(3): 201-208.

Magariños, B., Toranzo, A. E., Romalde, J.L. (1995a). *Different susceptibility of gilthead seabream and turbot to Pasteurella piscicida infection by the water route*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 15: 88-88.

Magariños, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. (1995b). *Response of Pasteurella piscicida and Flexibacter maritimus to skin mucus of marine fish*. Diseases of Aquatic Organisms, 21: 103-103.

Magariños, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1996a). *Adherence and invasive capacities of the fish pathogen Pasteurella piscicida*. FEMS Microbiology Letters, 138(1): 29-34.

Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J.L., Martí, M.J., Congregado, F., Toranzo, A.E., (1996b). *Influence of the capsular layer on the virulence of Pasteurella piscicida for fish*. Microbial Pathogenesis, 21(4): 289-297.

Magariños, B., Toranzo, A. E., Romalde, J.L., (1996c). *Phenotypic and pathobiological characteristics of Pasteurella piscicida*. Annual Review of Fish Diseases, 6: 41-64.

Magariños, B., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (1997). *Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Systematic and Applied Microbiology, 20(4): 634-639.

Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Nunez, S., Toranzo, A.E. (1999). *Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 19(4), 159-161.

Magariños, B., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L. (2000). *Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis*. Epidemiology and Infection, 125(01): 213-219.

Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E., Lamas, J. (2001). *Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (Sparus aurata)*. Aquaculture, 195(1): 17-21.

Mancuso, M. (2012). *Photobacteriosis Exchange between Wild and Farmed Fish in the Mediterranean Area*. J Aquacult Res Dev 3: e102. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000e102>.

Martínez-Manzanares, E., Tapia-Pianagua, S.T., Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Moriñigo, M. A. (2008). *Susceptibility of Photobacterium damsela subsp. piscicida strains isolated from Senegalese sole, Solea senegalensis Kaup, and gilthead seabream, Sparus aurata L., to several antibacterial agents*. Journal of Fish Diseases, 31(1): 73-76.

Martins, P., Navarro, R.V., Coelho, F.J., Gomes, N.C. (2015). *Development of a molecular methodology for fast detection of Photobacterium damsela subspecies in water samples*. Aquaculture, 435: 137-142.

Massault, C., Franch, R., Haley, C., De Koning, D.J., Bovenhuis, H., Pellizzari, C., Patarnello, T., Bargelloni, L. (2011). *Quantitative trait loci for resistance to fish pasteurellosis in gilthead sea bream (Sparus aurata)*. Animal Genetics, 42(2), 191-203.

Mladineo, I., Miletić, I., Bočina, I. (2006). *Photobacterium damsela subsp. piscicida outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna Thunnus thynnus*. Journal of Aquatic Animal Health, 18(1): 51-54.

Monfort, M.C. (2006). *Marketing of Aquacultured Finfish in Europe. Focus on Seabass and Seabream from the Mediterranean Basin*. GLOBEFISH. <http://www.globefish.org/upl/Publications/files/GRP%2086.pdf>.

Morii, H., Ishikawa, Y. (2012). *Cloning and nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol and erythromycin resistance genes on a transferable R plasmid from the fish pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Nagasaki University Faculty of Fisheries research report, 93: 41-50.

Muroga, K., Sugiyama, T., Ueki, N. (1977). *Pasteurellosis in cultured black sea bream (Mylio macrocephalus)*. Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University, 16: 17–21.

Nakai, T., Park, S.C., (2002). *Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture*. Research in Microbiology, 153: 13–18.

Nayak, S.K. (2010). *Probiotics and immunity: a fish perspective*. Fish & Shellfish Immunology, 29(1): 2-14.

Newman, S.G. (1993). *Bacterial vaccines for fish*. Annual Review of Fish Diseases, 3: 145-185.

Noga, E.J. (2010). *Fish disease: diagnosis and treatment*. John Wiley & Sons.

Noya, M., Magariños, B., Lamas, J. (1995a). *Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (Sparus aurata) and Pasteurella piscicida. A morphological study*. Aquaculture, 131(1): 11-21.

Noya, M., Magariños, B., Lamas, J. (1995b). *Intraperitoneal and dietary administration of glucan affects the non specific immune response and the resistance of gilthead seabream, Sparus aurata, to pasteurellosis*. In Proc. 5th Nat. Congress on Aquaculture (pp. 734-739), Publ. Universidad de Barcelona Spain.

Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L. (1999). *16S rRNA Gene Sequence Analysis of Photobacterium damsela and Nested PCR Method for Rapid*

Detection of the Causative Agent of Fish Pasteurellosis. Applied and Environmental Microbiology, 65(7): 2942-2946.

Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Barja, J.L. (2000). *Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of Photobacterium damsela.* Diseases of Aquatic Organisms, 40: 177-183.

Pereira, C., Salvador, S., Arrojado, C., Silva, Y., Santos, A. L., Cunha, Â., Gomes, N., Almeida, A. (2011). *Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy.* Journal of Environmental Monitoring, 13(4): 1053-1058.

Poulos, C., Bakopoulos, V., Zolota, V., Dimitriadis, G.J. (2004). *Histopathological findings after sea bass (Dicentrarchus labrax L.) exposure to extracellular products of Photobacterium damsela subsp. piscicida produced in vivo.* Aquaculture Research, 35(10): 931-936.

Rajan, P.R., Lin, J.Y., Ho, M.S., Yang, H.L. (2003). *Simple and rapid detection of Photobacterium damsela ssp. piscicida by a PCR technique and plating method.* Journal of Applied Microbiology, 95(6): 1375-1380.

Remuzgo-Martínez, S., Lázaro-Díez, M., Padilla, D., Vega, B., El Aamri, F., Icardo, J.M., Acosta, F., Ramos-Vivas, J. (2014). *New aspects in the biology of Photobacterium damsela subsp. piscicida: Pili, motility and adherence to solid surfaces.* Veterinary Microbiology, 174(1): 247-254.

Rodrigues, P.N.S., Pereira, F.A. (2004). *Effect of dietary iron overload on Photobacterium damsela ssp. piscicida pathogenicity in sea bass, Dicentrarchus labrax (L.).* Journal of Fish Diseases, 27(11): 673-676.

Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, F., Osorio, C.R., Toranzo, A.E. (1999). *Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis.* Journal of Microbiological Methods, 38(1): 147-154.

Romalde, J.L. (2002). *Photobacterium damsela subsp. piscicida: an integrated view of a bacterial fish pathogen.* International Microbiology, 5(1): 3-9.

Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrillón, M., Morinigo, M.A., Esteban, M.A. (2006). *Effect of*

heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (Sparus aurata L.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 111(3): 279-286.

Serracca, L., Ercolini, C., Rossini, I., Battistini, R., Giorgi, I., Prearo, M. (2011). *Occurrence of both subspecies of Photobacterium damsela in mullets collected in the river Magra (Italy).* Canadian Journal of Microbiology, 57(5): 437 - 440.

Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G. (1964). *Pasteurella sp. from an epizootic of white perch (Roccus americanus) in Chesapeake Bay tidewater areas.* Journal of Bacteriology, 88(6): 1814.

Stirling report, Stirling Institute of Aquaculture (2004). *Study of the market for aquaculture produced seabass and seabream species.* Report to the European Commission, DG Fisheries.

Thune, R.L., Stanley, L.A., Cooper, R.K., (1993). *Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish.* Annual Review of Fish Diseases, 3: 37-68.

Thune, R.L., Fernandez, D.H., Hawke, J.P., Miller, R. (2003). *Construction of a safe, stable, efficacious vaccine against Photobacterium damsela ssp. piscicida.* Diseases of Aquatic Organisms, 57(1-2): 51-58.

Thyssen, A., Grisez, L., Van Houdt, R., Ollevier, F., (1998). *Phenotypic characterization of the marine pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida.* International Journal of Systematic Bacteriology, 48(4): 1145-1151.

Thyssen, A., Van Eygen, S., Hauben, L., Goris, J., Swings, J., Ollevier, F. (2000). *Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of Photobacterium damsela subsp. piscicida.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(3): 1013-1019.

Thyssen, A., Ollevier, F. (2001). *In vitro antimicrobial susceptibility of Photobacterium damsela subsp. piscicida to 15 different antimicrobial agents.* Aquaculture, 200(3): 259-269.

Toranzo, A.E., Barja, J.L. Hetrick, F.H. (1982) *Survival of Vibrio anguillarum and Pasteurella piscicida in estuarine and freshwaters.* Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 3: 43-45.

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

Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L. (2005). *A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems*. Journal of Aquaculture, 246: 37-61.

Tsai, W.C., Kuo, T.Y., Lin, C.Y., Lin, J.C., Chen, W.J. (2015). *Photobacterium damsela subsp. piscicida responds to antimicrobial peptides through phage-shock-protein A (PspA)-related extracytoplasmic stress response system*. Journal of Applied Microbiology, 118(1): 27-38.

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

Wang, R., Feng, J., Su, Y., Ye, L., Wang, J. (2013). *Studies on the isolation of Photobacterium damsela subsp. piscicida from diseased golden pompano (Trachinotus ovatus Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity*. Veterinary Microbiology, 162(2): 957-963.

Zappulli, V., Patarnello, T., Patarnello, P., Frassinetti, F., Franch, R., Manfrin, A., Castagnaro, M., Bargelloni, L. (2005). *Direct identification of Photobacterium damsela subspecies piscicida by PCR-RFLP analysis*. Diseases of Aquatic Organisms, 65(1): 53-61.

Zorrilla, I., Balebona, M.C., Sarasquete, C., Borrego, J.J. (1999). *Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, Photobacterium damsela ssp. piscicida, from sole, Solea senegalensis (Kaup)*. Journal of Fish Diseases, 22(3): 167-172.

Ηλεκτρονικές πηγές:

http¹:

<http://portal.kathimerini.gr/4dcgi/warticleskathbreak108/06/2011393983>.

http²: <http://www.mass.gov/czm/wpfshlth.htm>.

