

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ανίχνευση του ιού της λεμφοκύστης σε εκτρεφόμενες τσιπούρες  
(*Sparus aurata*)**

**Αραμπατζή – Ζιάμου Δανάη**

Βόλος 2014

**«Ανίχνευση του ιού της λεμφοκύστης σε εκτρεφόμενες τσιπούρες (*Sparus aurata*)»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1. Ελένη Γκολομάζου, Λέκτορας - Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα.

2. Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής- Γενετική υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

3. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια - Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

***Αφιέρωση***

*Αφιερώνω την παρούσα διπλωματική εργασία στους γονείς μου, για την αμέριστη ηθική και υλική στήριξη, τη συμπαράσταση και τη συνεχή τους ενθάρρυνση σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα Γκολομάζου Ελένη για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Εξαδάκτυλο Αθανάσιο και Παναγιωτάκη Παναγιώτα, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γκάφα Γεώργιο για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του, με σκοπό την ολοκλήρωση του πειράματος, καθώς επίσης όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## Περίληψη

Ο ιός της λεμφοκύστης ανήκει στην οικογένεια Iridoviridae και έχει ανιχνευτεί σε περισσότερα από 125 είδη ψαριών. Η ασθένεια έχει μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό μικρών οζιδίων. Ο τρόπος μετάδοσης του ιού δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί ενώ μόνο η οριζόντια μετάδοση του ιού μέχρι σήμερα έχει επιβεβαιωθεί. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του ιού της λεμφοκύστης σε αυγά και λάρβες τσιπούρας προερχόμενα από ασυμπτωματικούς γεννήτορες. Γονιμοποιημένα αυγά και λάρβες τσιπούρας από ιχθυογεννητικό σταθμό με ιστορικό στον ιό της λεμφοκύστης εξετάστηκαν με σκοπό την ανίχνευση του συγκεκριμένου ιού με την τεχνική LAMP. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά δέκα δειγματοληψίες. Μία δειγματοληψία αυγών 2 ημέρες πριν την εκκόλαψη και εννιά δειγματοληψίες λαρβών τις ημέρες 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30 μετά την εκκόλαψη. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν 10 δείγματα, στα οποία γινόταν απολύμανση με διάλυμα ιωδίου 50mg/l για 10'. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ο ιός ανιχνεύτηκε τόσο στα αυγά όσο και στις λάρβες σε ποσοστά προσβολής 70% και 80-100% αντίστοιχα ενισχύοντας την πιθανότητα της κάθετης μετάδοσης του ιού. Η απολύμανση με διάλυμα ιωδίου δεν επηρέασε την μετάδοση του ιού γεγονός που υποδεικνύει ότι έγινε πιθανόν μέσω του εμβρύου. Τέλος η ζωντανή τροφή πιθανόν δεν επηρέασε τη μετάδοση του ιού αφού τα ποσοστά προσβολής παρέμειναν υψηλά πριν και μετά τη χορήγηση της.

*Λέξεις κλειδιά: λεμφοκύστη, αυγά και λάρβες τσιπούρας, κάθετη μετάδοση, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*

**Abstract**

Lymphocystis disease virus (LCDV) is a member of Iridoviridae family and it has been reported from over 125 fish species. It is a widely spread disease and its main sign is the appearance of small white to grey nodular lesions. The transmission of this virus has not been completely elucidated, while direct transmission is accepted. In the present study LCDV was detected in fertilized eggs and larvae from asymptomatic gilthead seabream broodstock of a hatchery with previous reports in this disease, by LAMP. Ten samplings were carried out in total. One egg sampling -2 day pre-hatching and nine larvae samplings 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34 days post-hatching. 10 samples were examined in each sampling after disinfection by dipping in active iodine 50mg/l for 10 min. According to the results, LCDV was detected in eggs and larvae with prevalence 70% and 80-100%, respectively, indicating its potential vertical transmission. Disinfection by dipping in active iodine did not change prevalence indicating intra-ovum transmission. Finally feeding with live food probably did not affect the virus transmission as prevalence remained in the same high levels before and after its supply.

*Keywords: Lymphocystis Disease Virus, gilthead seabream eggs and larvae, vertical transmission, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1.Γενικά για υδατοκαλλιέργειες.....	9
1.2.Εντατική εκτροφή τσιπούρας.....	9
1.3.Ασθένειες.....	12
1.4.Ο ιός της λεμφοκύστης (lymphocystis disease virus, LCDV).....	13
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.1.Λήψη δειγμάτων.....	16
2.2.Απομόνωση ολικού γονιδιώματος DNA.....	16
2.3.Μοριακή τεχνική LAMP.....	17
2.4.Επαλήθευση τεχνικής.....	18
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	19
3.1.Απομόνωση ολικού γονιδιώματος DNA.....	19
3.2.Μοριακή τεχνική LAMP.....	19
3.3.Επαλήθευση τεχνικής.....	21
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	22
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	25
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	26
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	31



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

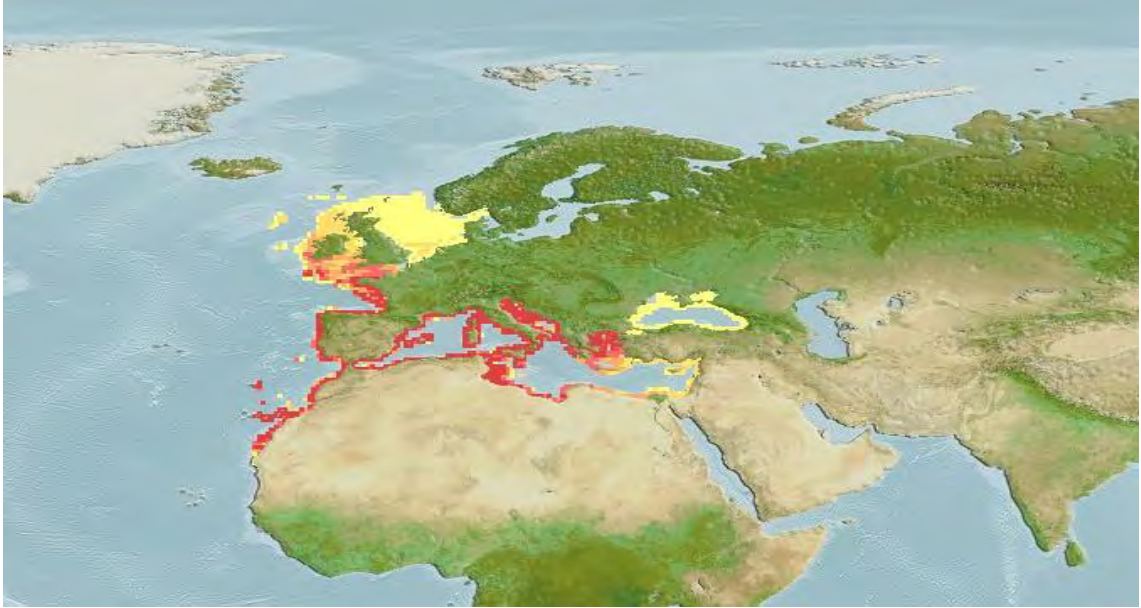
### 1.1.Γενικά για υδατοκαλλιέργειες

Οι υδατοκαλλιέργειες περιλαμβάνουν την εντατική εκτροφή ιχθύων, δίθυρων και μαλακίων, υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Αποτελούν τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα παραγωγής τροφίμων, εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης των ιχθύων. Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα ξεκίνησαν από το 1951, στην προσπάθεια εμπλουτισμού των ορεινών ρεόντων υδάτων με την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), ενώ τώρα είναι από τις πιο δυναμικές χώρες στην μεσόγειο για την εντατική εκτροφή τσιπούρας και λαβρακιού (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2010). Η εντατική εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών είχε ραγδαία ανάπτυξη κατά την αρχή του εικοστού αιώνα παγκοσμίως. Πιο συγκεκριμένα, στην Ελλάδα αναπτύχθηκε ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας εξαιτίας των ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούν και την αυξημένης αλιευτικής πίεσης που δέχονταν τα ιχθυαποθέματα (Φώτης & Αγγελίδης, 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύρια είδη εκτροφής στην Ελλάδα είναι η τσιπούρα και το λαβράκι με συνολική παραγωγή περίπου 120000 τόνους το 2004. Το ποσό αυτό αντιπροσωπεύει το 49% της συνολικής παραγωγής των Μεσογειακών χωρών (Παπουτσόγλου 2008).

### 1.2.Εντατική εκτροφή τσιπούρας

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) ανήκει στη οικογένεια Sparidae και είναι ένα από τα κύρια θαλάσσια είδη, στο οποίο η εντατική εκτροφή είναι επιτυχής. Η πρώτη εκτροφή της, έγινε στην αρχή της δεκαετίας του 1980 στην Ιταλία, τη Γαλλία και την Ισπανία,

ενώ στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκε στο τέλος της ίδιας δεκαετίας. Μέχρι σήμερα, η Ελλάδα είναι η πρώτη σε παραγωγή χώρα της τσιπούρας στη Μεσόγειο και την Ευρώπη (Παπουτσόγλου, 2008). Στη φύση, η τσιπούρα διαβιεί στο σε αμμώδεις πυθμένες ή με βλάστηση σε παράκτιες περιοχές με απόσταση από την ακτή από 1 έως 30 μέτρα. Πολλές φορές εισέρχεται σε λιμνοθάλασσες και σε δέλτα ποταμών και είναι μοναχικό ψάρι ή σχηματίζει μικρά κοπάδια. Είναι σαρκοφάγο είδος και τρέφεται κυρίως με ζωοπλαγκτόν, μικρά καρκινοειδή, πολύχαιτους, μαλάκια, έντομα, οστρακοειδή και με μικρά ψάρια (Fishbase). Επιπλέον, είναι πρωτανδρικό είδος και η αλλαγή φύλου πραγματοποιείται στην ηλικία των 2 με 3 ετών. Η ωοτοκία στη Μεσόγειο έχει παρατηρηθεί κατά τους μήνες Σεπτέμβριο έως Δεκέμβριο και τα αυγά είναι πελαγικά. Το είδος της τσιπούρας έχει βρεθεί στη Μεσόγειο, στον Ανατολικό Ατλαντικό, στα Βρετανικά νησιά, στα Στενά Γιβραλτάρ, στο Πράσινο ακρωτήριο, στα Κανάρια νησιά και στη Μαύρη θάλασσα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Απεικόνιση της γεωγραφικής εξάπλωσης της τσιπούρας (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) (πηγή: fishbase.org.)

Οι κύριες χώρες παραγωγής τσιπούρας από εντατική εκτροφή είναι η Ελλάδα με 49 %, η Τουρκία με 15 %, η Ισπανία με 14 %, η Ιταλία με 6 %, η Κροατία, η Αίγυπτος, η Γαλλία, η Μάλτα, το Μαρόκο, η Πορτογαλία, το Ισραήλ με 3 %, το Κουβέιτ και το Ομάν. Για την εντατική εκτροφή χρησιμοποιούνται δεξαμενές χωρητικότητας 200 έως 3.000 κυβικά μέτρα ενώ το FCR έχει παρατηρηθεί στο 1,3-1. Από την αρχή της πάχυνσης της τσιπούρας έως το εμπορεύσιμο μέγεθος, το οποίο είναι 350-400 γραμμάρια, χρειάζεται να περάσουν περίπου 16 μήνες σε θερμοκρασίες από 18° C έως 26° C. Η διατροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες. Στα εναρκτήρια σιτηρέσια, στα σιτηρέσια κύριας εκτροφής και στα σιτηρέσια γεννητόρων. Τα εναρκτήρια σιτηρέσια χορηγούνται έως τα 2 γραμμάρια ατόμων, και περιλαμβάνουν ζωντανή τροφή, όπως τροχόζωα εμπλουτισμένα με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (FAO).

### 1.3. Ασθένειες

Εξαιτίας της μεγάλης και ταχείας ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών, έχουν δημιουργηθεί αρκετά προβλήματα στις μονάδες εντατικής εκτροφής από νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν νοσήματα που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, σε ιούς, βακτήρια, παράσιτα, μύκητες, αλλά και σε διατροφικά σφάλματα και νεοπλάσματα. Για αυτό το λόγο κρίνεται αναγκαία η επίλυση αυτών των προβλημάτων, που προκαλούν μεγάλες ζημιές στις υδατοκαλλιέργειες (Coscelli *et al.* 2014). Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που αφορούν την ανίχνευση, αντιμετώπιση και πρόληψη των ασθενειών, αλλά ο κλάδος της ιχθυοπαθολογίας είναι ακόμα στο στάδιο της εξέλιξης. Συνεπώς, απαιτείται η συνεχής μελέτη και έρευνα των νοσημάτων, με σκοπό την επίλυση των προβλημάτων. Εξαιτίας της μεγάλης ανάπτυξης της υδατοκαλλιέργειας, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την πρόληψη και την καταπολέμηση των ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια (Φώτης & Αγγελίδης, 2003). Η γνώση της ιχθυοπαθολογίας είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση των ασθενειών, αλλά και για την προστασία της δημόσιας υγείας από τα νοσήματα των ψαριών, τα οποία μεταδίδονται στον άνθρωπο. Η διάγνωση από τα εξωτερικά εμφανή συμπτώματα είναι δύσκολη εξαιτίας των παρόμοιων συμπτωμάτων που παρουσιάζουν οι περισσότερες από τις ασθένειες των ψαριών (Antuofermo *et al.* 2014). Συνεπώς, πολλές φορές, όταν πλέον εκδηλωθεί η ασθένεια, είναι αργά για οποιαδήποτε ενέργεια. Ακόμη, τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες που προκαλούν τέτοια προβλήματα, υπάρχουν ούτως ή άλλως στο περιβάλλον, ως μέρος της φυσικής χλωρίδας και πανίδας του, χωρίς να είναι παθογόνα. Παρ' όλα αυτά, όταν πραγματοποιηθούν αλλαγές στις συνθήκες του νερού (όπως αλλαγές θερμοκρασίας, pH, κ.λπ.), δημιουργείται καταπόνηση στα ψάρια

με αποτέλεσμα να γίνονται ευάλωτα σε τέτοιες παθήσεις. Εφόσον αρκετές ασθένειες έχουν σαν συνέπεια την μεγάλη θνησιμότητα, η έγκαιρη διάγνωση αυτών είναι αρκετά σημαντική, εξαιτίας της οικονομικής ζημίας των μονάδων εκτροφής (Zhang *et al.* 2014).

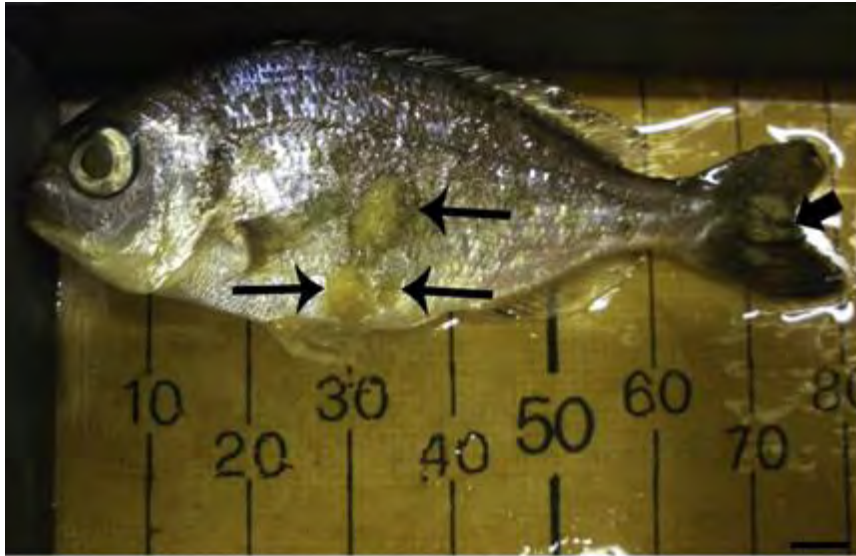
#### 1.4. Ο ιός της λεμφοκύστης (lymphocystis disease virus, LCDV)

Ο ιός της λεμφοκύστης (LCDV) ανήκει στην οικογένεια Iridoviridae και έχει ανιχνευτεί σε αρκετά είδη ψαριών. Έχουν βρεθεί αρκετά στελέχη του ιού, όπως ο LCDV-1, ο οποίος έχει ανιχνευτεί σε πλατύψαρα της Ευρώπης, ο LCDV-C, ο LCDV-cn και ο LCDV-RC σε πλατύψαρα της Κίνας, καθώς και ο LCDV-K1 και ο LCDV-RF στην Κορέα (Wenbin *et al.* 2010, Tidona *et al.* 1997). Προσβάλλει αρκετά άγρια και εντατικώς εκτρεφόμενα είδη γλυκών, υφάλμυρων και θαλασσινών νερών παγκοσμίως. Παρ' όλα αυτά, η πρώτη απομόνωση του ιού από άτομα εκτρεφόμενης τσιπούρας πραγματοποιήθηκε στο Ισραήλ (Alonso *et al.* 2005). Μπορεί να μολύνει πάνω από 140 είδη ιχθύων και έχει βρεθεί σε πολλές χώρες της Ευρώπης, της Αμερικής και τα τελευταία χρόνια σε πολλές χώρες της Ασίας, όπως στην Κίνα, στην Ιαπωνία και στην Κορέα (Li *et al.* 2010). Ο ιός της λεμφοκύστης προσβάλλει αρκετά είδη, που ανήκουν σε περισσότερες από 34 οικογένειες παγκοσμίως. Σε μερικά είδη που μελετήθηκαν, βρέθηκαν οζίδια στην περιοχή των πτερυγίων και στον συνδετικό ιστό κάτω από την επιδερμίδα (Hossain and Oh 2011).

Ο ιός σπάνια προκαλεί μεγάλη θνησιμότητα στα ψάρια, αλλά τα καθιστά μη εμπορεύσιμα (Li *et al.* 2010). Το ποσοστό της θνησιμότητας που προκαλεί, έχει βρεθεί περίπου στο 30% σε πλατύψαρα της Κίνας, ενώ τυπικά είναι μια χρόνια ασθένεια, που

συνήθως παρατηρείτε ανάρρωση έπειτα από μερικές εβδομάδες και οι κύριες πηγές εισόδου του ιού είναι το δέρμα και τα βράγχια (Wenbin *et al.* 2010, Tidona *et al.* 1997), ενώ δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω η κάθετη μετάδοση. Ο ιός της λεμφοκύστης είναι μια αυτοπεριοριζόμενη και χρόνια ασθένεια και εμφανίζει οζίδια κυρίως στο δέρμα, στα πτερύγια και στην ουρά. Αν και δεν προκαλεί μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας, τα μολυσμένα άτομα είναι ευαίσθητα σε άλλες δευτερογενείς ασθένειες και παρουσιάζουν χαμηλή ανάπτυξη. Για αυτό το λόγο, η εκδήλωση της ασθένειας μπορεί να προκαλέσει μεγάλη οικονομική ζημία στις εντατικές εκτροφές (Alonso *et al.* 2005).

Ο ιός της λεμφοκύστης εμφανίζει οζίδια με υπερτροφικά βλαστικά κύτταρα στο δέρμα και στα πτερύγια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 (Cano *et al.* 2006). Τα υπερτροφικά κύτταρα της λεμφοκύστης βρίσκονται κυρίως στο δέρμα, στα πτερύγια και μερικές φορές γύρο από το στόμα (Jang *et al.* 2011). Τα ώριμα κύτταρα του ιού περιβάλλονται από μια υαλώδη κάψουλα, που περιέχει θειικές γλυκοπρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια (Cano *et al.* 2009). Πολλοί παράγοντες μπορούν να πυροδοτήσουν τα συμπτώματα της ασθένειας, όπως η καταπόνηση, η διατροφή των ατόμων και οι φυσικοχημικοί παράγοντες (Cano *et al.* 2006). Παρ' όλα αυτά, τα μολυσμένα άτομα αναρρώνουν έπειτα από μερικές βδομάδες (Cano *et al.* 2009).



Εικόνα 2: Απεικόνιση μολυσμένου ατόμου τσιπούρας με τον ιό της λεμφοκύστης, όπου τα συμπτώματα της ασθένειας είναι εμφανή (Dezfuli *et al.* 2012).

Για την ανίχνευση του ιού χρησιμοποιούνται αρκετές μέθοδοι, όπως η κυτταροκαλλιέργεια, η ανάπτυξη πολύκλωνων αντισωμάτων και ανοσοαποτύπωση, η υβριδοποίηση *in situ* και η μέθοδος της ποσοτικής PCR. Επίσης, χρησιμοποιούνται και τα μονοκλωνικά αντισώματα, η μέθοδος ELISA και Western blot για την ανίχνευση του ιού της λεμφοκύστης (Wenbin *et al.* 2010, Tidona *et al.* 1997).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του ιού της λεμφοκύστης σε αυγά και λάρβες τσιπούρας προερχόμενα από ασυμπτωματικούς γεννήτορες, καθώς και η εφαρμογή και τροποποίηση πρωτοκόλλων της μοριακής τεχνικής LAMP σε εντατικά εκτρεφόμενες τσιπούρες με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση του ιού της λεμφοκύστης.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Λήψη δειγμάτων

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν γονιμοποιημένα αυγά και λάρβες από τσιπούρα (*Sparus aurata*), τα οποία προέρχονταν από ιχθυογεννητικό σταθμό με ιστορικό στον ιό της λεμφοκύστης. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά δέκα δειγματοληψίες. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη δειγματοληψία αυγών έγινε την ημέρα -2 πριν την εκκόλαψη, και οι υπόλοιπες εννέα από λάρβες τις ημέρες 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30 και 34 αντίστοιχα μετά την εκκόλαψη. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δέκα δείγματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε απολύμανση με διάλυμα ιωδίου 50 mg/l για δέκα λεπτά για την αποφυγή της επιμόλυνσης (Moretti *et al.* 1999). Κάθε δείγμα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες κυβέττες και αποθηκεύονταν στην κατάψυξη στους -80° C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

### 2.2. Απομόνωση ολικού γονιδιώματος DNA

Η απομόνωση του ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο φαινόλης/χλωροφορμίου (Sambrook *et al.* 1989) και τα δείγματα διατηρήθηκαν σε διάλυμα Tris-EDTA (TE), μέχρι την επεξεργασία τους. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους των αυγών, στα συγκεκριμένα δείγματα έγινε διαμόρφωση της τεχνικής του πρωτοκόλλου, με την μείωση κατά 90% των ποσοτήτων των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, για τις λάρβες, χρησιμοποιήθηκαν 500 μl TNE, 100 μl SDS, 100 μl Tris-HCl και 10 μl Proteinase k σε κάθε δείγμα, και έπειτα από δίωρη επώαση σε υδατόλουτρο, προστέθηκαν 300 μl φαινόλης και 300 μl



χλωροφόρμιο-ισοαμυλική (24/1), ενώ για τα αυγά χρησιμοποιήθηκαν 50 μl TNE, 10 μl SDS, 10 μl Tris-HCl και 1 μl Proteinase k, καθώς και 30 μl φαινόλης και χλωροφόρμιο-ισοαμυλική. Στη συνέχεια τα μίγματα φυγοκεντρίθηκαν στις 12000 στροφές για δέκα λεπτά στους 4 °C και χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο. Σε αυτό, προστέθηκαν 600 μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική για τις λάρβες και 60 μl για τα αυγά και φυγοκεντρίθηκαν, έτσι ώστε να παραμείνει το υπερκείμενο. Κατόπιν, προστέθηκε 1 ml καθαρής αλκοόλης, καθώς και 10 μl sodium acetate στα δείγματα των λαρβών και 100 μl και 1 μl αντίστοιχα για τα δείγματα των αυγών και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20 °C για τριάντα λεπτά. Έπειτα, οι κυβέττες φυγοκεντρίθηκαν, έτσι ώστε να κατακρατηθεί η πελλέτα, η οποία ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Τέλος, το DNA διαλύθηκε σε διάλυμα TE και φυλάχτηκε στην κατάψυξη στους -80 °C, έως ότου χρησιμοποιηθεί. Από την απομόνωση του ολικού DNA των δειγμάτων, τα διαλύματα μετρήθηκαν σε nanodrop καθώς και σε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, με σκοπό την καλύτερη εικόνα της ποσότητας του DNA.

### 2.3.Μοριακή τεχνική LAMP

Για την μοριακή τεχνική LAMP χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις εκκινητές σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία (Li *et al.* 2010), οι :

- FIP(5'-ACCGAAAAAAGGATTTTAATGGCATTTCCTCTAACTATTC CAAGTCCTA-3'),
- BIP(5'-CCAGTTCTTCTCCTGTAATCTTTGA-TTTT-GATCAGCAGCAA TAC CCG-3'),
- F3 (5'-AC AAACAGCACCTAAACATG-3') και

- B3(5'-CGAGCACTATTTTCATAAACCAA-3').

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2μl DNA, 6μl Thermopol Buffer, 0,8 μl dNTPs, 2μl Primer FIP και BIP, 1μl Primer F3 και B3, 1μl Bst Taq και συμπληρώθηκε με υπερκάθαρο νερό έως τα 25μl. Η αντίδραση επώαστηκε για 1 ώρα στους 60°C και εν συνεχεία για 2 λεπτά στους 80°C για τον τερματισμό της.

#### 2.4.Επαλήθευση τεχνικής

Για την επαλήθευση ανίχνευσης του ιού της λεμφοκύστης και την αποτελεσματικότητα της LAMP χρησιμοποιήθηκε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1% καθώς και SYBR-Green ως χρωστική ανίχνευσης. Συνολικά εξετάστηκαν 100 δείγματα για την ανίχνευση του ιού της λεμφοκύστης. Παράλληλα, ψάρια του είδους *Dentex macropthalmus* Bloch1791, τα οποία δεν έχουν καταγραφεί ως φορείς του ιού και δεν εμφάνιζαν κλινικά συμπτώματα, χρησιμοποιήθηκαν ως μη μολυσμένα δείγματα ενώ ως θετικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μολυσμένες τσιπούρες με τον ιό της λεμφοκύστης, στις οποίες τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν εμφανή. Πιο συγκεκριμένα, εμφάνιζαν οζίδια στο δέρμα και στη στοματική κοιλότητα.

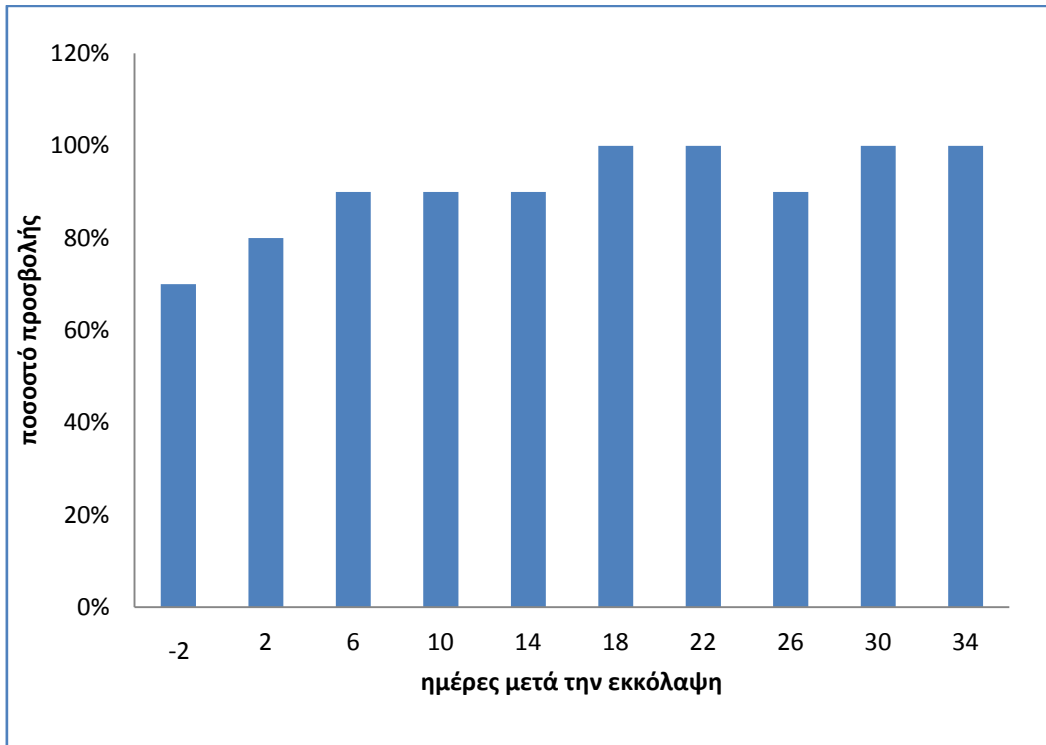
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Απομόνωση ολικού γονιδιώματος DNA

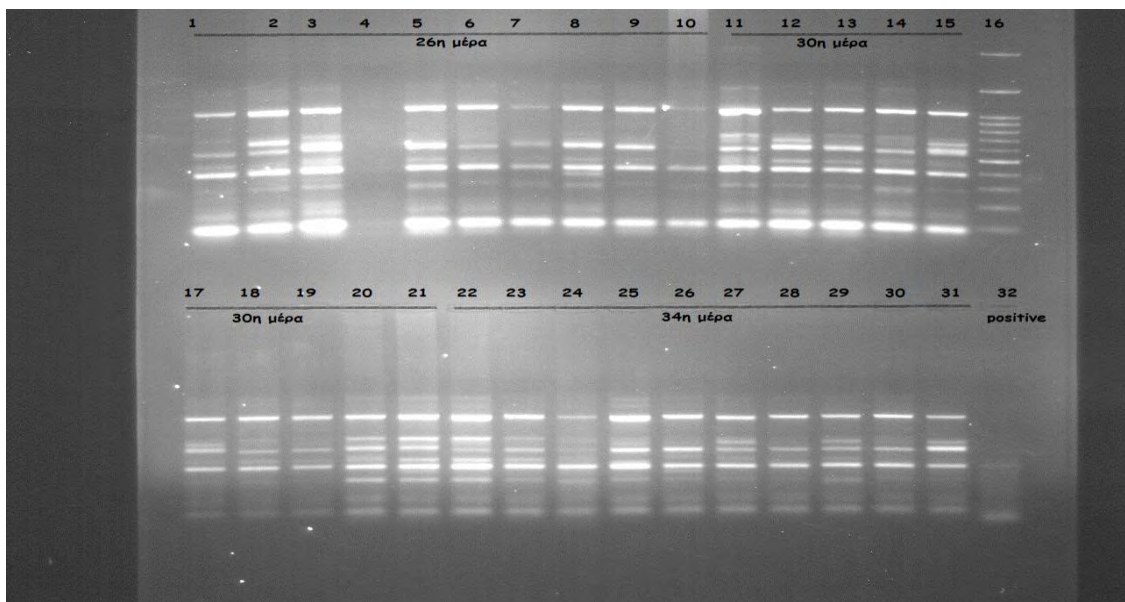
Από τα αποτελέσματα της τεχνικής φαίνεται ότι η ποιότητα του ολικού γονιδιώματος ήταν ικανοποιητική, ενώ στα δείγματα αυγών παρατηρήθηκε ελάχιστη ποσότητα DNA της τάξης του 9-14 ng/uL. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος LAMP λειτούργησε κανονικά, εξαιτίας της χρήσης 2μl του DNA αντί της συνηθέστερης χρήσης 1μl από τα δείγματα.

#### 3.2. Μοριακή τεχνική LAMP

Τα αποτελέσματα από τη μοριακή τεχνική LAMP δείχνουν ότι σε όλες τις ημέρες δειγματοληψίας ανιχνεύθηκε ο ιός της λεμφοκύστης. Πιο συγκεκριμένα, τα ποσοστά προσβολής του ιού κυμαίνονταν από 70% στα αυγά και 80-100% στις λάρβες αντίστοιχα (Γράφημα 1). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του ιού στα θετικά δείγματα τσιπούρας, σε αντίθεση με τα δείγματα του είδους *D. Macrophthalmus*, τα οποία βρέθηκαν αρνητικά στον ιό (Εικόνα 3).



Γράφημα 1. Ποσοστό προσβολής από τον ιό της λεμφοκύστης για όλες τις δειγματοληψίες, αυγά ημέρας -2 πριν την εκκόλαψη και λάρβες ημέρες 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34 μετά την εκκόλαψη.



Εικόνα 3: Αποτελέσματα από την μέθοδο LAMP σε δείγματα λάρβας 26, 30 και 34 ημέρα μετά την εκκόλαψη. Το τελευταίο δείγμα είναι γνωστό θετικό του ιού για επαλήθευση της τεχνικής.

### 3.3.Επαλήθευση τεχνικής

Για τις μεθόδους επαλήθευσης της τεχνικής LAMP χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR-Green, κατά την οποία με την ύπαρξη του ιού, φαινόταν διαφορετικό χρώμα. Πιο συγκεκριμένα, το χρώμα στα δείγματα τα οποία ήταν αρνητικά στον ιό ήταν πορτοκαλί, ενώ στα δείγματα θετικά στον ιό της λεμφοκύστης παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος σε πράσινο. Με αυτόν τον τρόπο επαληθεύεται η ύπαρξη του ιού και η αποτελεσματικότητα της τεχνικής LAMP.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ιός της λεμφοκύστης είναι μια από τις πιο συχνά παρατηρούμενες ιογενείς ασθένειες των ιχθύων σε εντατικές εκτροφές της τσιπούρας. Αν και δεν προκαλεί σημαντικές θνησιμότητες, κάνει τα ψάρια μη εμπορεύσιμα, με αποτέλεσμα την οικονομική ζημία των μονάδων εκτροφής. Ο τρόπος μετάδοσης του ιού δεν έχει αποσαφηνιστεί, επειδή δεν έχει διερευνηθεί συστηματικά το ενδεχόμενο της κάθετης μετάδοσής του, ενώ είναι επιβεβαιωμένη η μετάδοση μέσω του δέρματος, των βραγχίων και του πεπτικού σωλήνα (Wolf 1988, Bowser *et al.* 1999). Σύμφωνα με τους Cano *et al.* (2013) ο ιός της λεμφοκύστης μπορεί να μεταδοθεί από κλινικά υγιείς γεννήτορες οι οποίοι είναι ασυμπτωματικοί φορείς και η μετάδοση γίνεται μόνο μέσω της επιφάνειας του αυγού όπως και στις περιπτώσεις άλλων ιών (Brock & Bullis 2001). Η κάθετη μετάδοση έχει επιβεβαιωθεί σε ιογενείς ασθένειες ψαριών (Bootland *et al.* 1991, Breuil *et al.* 2002, Georgiadis *et al.* 2001, MacAllister *et al.* 1993, Mulcahy & Pascho 1985, Mushiake *et al.* 1994, Nylund *et al.* 2007). Στις περιπτώσεις αυτές ο μολυσματικός παράγοντας μπορεί να εντοπίζεται μέσα ή έξω από τους γαμέτες ή το έμβρυο. Επίσης, ο ρόλος των θηλυκών και των αρσενικών δεν έχει διευκρινιστεί και η μετάδοση σε πολλές περιπτώσεις είναι πιθανό να γίνεται τόσο μέσω του ωαρίου όσο και μέσω του σπερματοζωαρίου (Brock & Bullis 2001).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας προέκυψε ότι ο ιός της λεμφοκύστης ανιχνεύτηκε τόσο στα αυγά όσο και στις λάρβες που εξετάστηκαν. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα δείγματα προέρχονταν από ασυμπτωματικούς γεννήτορες και με το ότι δεν υπήρχε ενεργή λοίμωξη ενισχύουν την πιθανότητα της κάθετης μετάδοσης του ιού. Η απολύμανση με διάλυμα ιωδίου δεν περιόρισε την μετάδοση του ιού, γεγονός που υποδεικνύει ότι έγινε πιθανόν μέσω του εμβρύου σε

αντίθεση με τους Cano *et al.* (2013). Η απολύμανση μπορεί να πραγματοποιηθεί με έξι διαφορετικές ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ιώδιο, ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου (QAC), υπεροξειδία, φαινόλες, χλώριο και γλουταραλδεΐδη (Charpman 2003). Στη παρούσα μελέτη, η απολύμανση έγινε με τη χρήση ιωδίου, εξαιτίας της βιβλιογραφικής αναφοράς των Cano *et al.*, 2013.

Επίσης το στάδιο χορήγησης της ζωντανής τροφής κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό αφού μέσω αυτής είναι πιθανό να μεταδοθεί ο ιός. Στην παρούσα έρευνα τα ποσοστά προσβολής παρέμεινα υψηλά πριν και μετά τη χορήγηση ζωντανής τροφής, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ζωντανή τροφή πιθανόν δεν επηρέασε τη μετάδοσης του ιού.

Ο έλεγχος της ασθένειας που οφείλεται στον ιό της λεμφοκύστης βασίζεται σε προληπτικές διαχειριστικές πρακτικές που σχετίζονται με την επιλογή και την εκτροφή των γεννητόρων, τη συλλογή και διατήρηση των γαμετών, την εκκόλαψη των αυγών και τη διαχείριση των λαρβών (Brock & Bullis 2001). Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή τους είναι η εφαρμογή διαγνωστικών τεχνικών που εξασφαλίζουν έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση πριν την έξαρση της ασθένειας μειώνοντας τις δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις στην εντατική εκτροφή της τσιπούρας.

Η τεχνική LAMP έχει αναπτυχθεί για την εξειδικευμένη, ευαίσθητη και ταχύτατη ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων υπό ισοθερμικές συνθήκες. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί Bst DNA παλυμεράση καθώς και ειδικούς εκκινητές, οι οποίοι αναγνωρίζουν ένα σύνολο από έξι διακριτές αλληλουχίες στο DNA στόχο. Το γεγονός αυτό, έχει σαν αποτέλεσμα την εξαιρετικά επιλεκτική ενίσχυση του τμήματος του DNA (Li *et al.* 2010). Η τεχνική αυτή παρέχει υψηλή ευαισθησία και επιτρέπει την οπτική αξιολόγηση της αντίδρασης με την αλλαγή χρώματος του SYBR-Green, καθώς και τον διαχωρισμό των διαφόρων ζωνών διαφορετικού μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση σε

πήκτωμα αγαρόζης (Notomi et al. 2000). Σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία (Li *et al.* 2010) η αντίδραση έχει καλύτερα αποτελέσματα στις θερμοκρασίες από 59° C έως 65° C. Παρ' όλα αυτά, στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν βέλτιστα αποτελέσματα στους 60° C. Επιπλέον, η τεχνική LAMP έχει δέκα φορές υψηλότερο όριο ανιχνευσιμότητας σε σχέση με την συμβατική τεχνική της PCR, ενώ βρέθηκε ισοδύναμο όριο με την real-time PCR.



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύονται οι πιθανότητες της κάθετης μετάδοσης του ιού της λεμφοκύστης, εξαιτίας της ύπαρξης του ιού σε όλες τις κλάσεις ηλικίας που εξετάστηκαν. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα δείγματα προέρχονταν από ασυμπτωματικούς φορείς και ότι με την απολύμανση με διάλυμα ιωδίου δεν περιορίστηκε η ανίχνευση του ιού υποδεικνύει ότι η μετάδοση έγινε πιθανόν μέσω του εμβρύου.

Επιπλέον, υποδεικνύεται ότι η χορήγηση ζωντανής τροφής στις λάρβες πιθανόν να μην επηρεάζει τη μετάδοση του ιού, εφόσον τα ποσοστά προσβολής πριν και μετά από αυτήν παρέμειναν υψηλά.

Τέλος, στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα της τεχνικής LAMP για την ανίχνευση του ιού της λεμφοκύστης σε σχέση με την συμβατική τεχνική της PCR, καθώς η αντίδραση της τεχνικής LAMP ρυθμίστηκε στους 60° C για βέλτιστα αποτελέσματα.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alonso M.C, Cano I., Garcia-Rosado E., CastroD, LamasJ, Barja J. L. and Borrego J J (2005) Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo*. *Journal of Fish Diseases*, 28: 221–228

Antuofermo E., Pais A., Nuvoli S., Hetzel U., Burrai J.P., Stefano Rocca, Caffara M., Giorgi I., Pedron C., Prearo M. (2014) *Mycobacterium chelonae* associated with tumor-like skin and oral masses in farmed Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*). *BMC Veterinary Research* 10: 18

Bowser P.R., Wooster G.A., Getchell R.G. (1999). Transmission of walleye dermal sarcoma and lymphocystis via the waterborne exposure. *Journal of Aquatic Animal Health* 11: 158–161.

Bootland, L.M., Dobos, R., Stevenson, R.M.W. (1991). The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 13–21.

Breuil G., Pepin J.F.P., Boscher S., Thiery R. (2002). Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* 25: 697–702.

Brock J.A. & Bullis R. (2001) Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. *Aquaculture* 197: 137–159.

Cano I., Alonso M.C., Garcia-Rosado E., Rodriguez Saint-Jean S., Castro D., Borrego Juan J. (2006) Detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in asymptomatic cultured gilt-head

seabream (*Sparus aurata*, L.) using an immunoblot technique. *Veterinary Microbiology* 113: 137–141

Cano I., Ferro P., Alonso M.C., Sarasquete C., Garcia-Rosado E., Borrego J J and Castro D.(2009) Application of in situ detection techniques to determine the systemic condition of lymphocystis disease virus infection in cultured gilt-head seabream, *Sparus aurata* L.. *Journal of Fish Diseases* 32: 143–150

Cano I, Valverde E J, Garcia-Rosado E, Alonso M C, Lopez-Jimena B, Ortiz-Delgado J B, Borrego J J, Sarasquete C and Castro D (2013) Transmission of lymphocystis disease virus to cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae. *Journal of Fish Diseases* 36: 569–576

Chapman J. S. (2003) Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51: 271 – 276

Coscelli G.A., Bermúdez R., Losada A.P., Faílde L.D., Santos Y., Quiroga M.I. (2014) Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Histopathological and immunohistochemical studies. *Aquaculture* 430: 79–85

Dezfuli B.S., Lui A., Giari L., Castaldelli G., Mulero V., Noga E.J. (2012) Infiltration and activation of acidophilic granulocytes in skin lesions of gilthead seabream, *Sparus aurata*, naturally infected with lymphocystis disease virus. *Developmental and Comparative Immunology* 36: 174–182

Georgiadis M.P., Hedrick R.P., Carpenter T.E. & Gardner I.A. (2001). Factors influencing transmission, onset and severity of outbreaks due to white sturgeon iridovirus in a commercial hatchery. *Aquaculture* 194: 21–35.

Hossain M. and Oh M.J. (2011) Histopathology of Marine and Freshwater Fish Lymphocystis Disease Virus (LCDV). *Sains Malaysiana* 40(10): 1049–1052

Jang H B, Kim Y R, Cha I S, Noh S W, Park S B, Ohtani M, Hikima J, Aoki T and Jung T S (2011) Detection of antigenic proteins expressed by lymphocystis virus as vaccine candidates in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 34: 555–562

Li Q., Yue Z., Liu H., Liang C., Zheng X., Zhao Y., Chen X., Xiao X., Chen C. (2010) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of lymphocystis disease virus. *Journal of Virological Methods* 163 : 378–384

MacAllister P.E., Schill W.B., Owens W.J. & Hodge D.L. (1993). Determining the prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic brook trout *Salvelinus fontinalis*: a study of clinical samples and processing methods. *Diseases of Aquatic Organisms* 15: 157–162.

Moretti A., Fernandez-Criado M.P., Cittolin G., Guidastri R. (1999). *Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream, Vol. 1.* Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Mulcahy D., Pascho R.J. (1985). Vertical transmission of infectious haematopoietic necrosis virus in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum): isolation of the virus from dead eggs and fry. *Journal of Fish Diseases* 8: 393–396.

Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994). Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology* 29: 177–182.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28, E63.

Nylund A., Plarre H., Karlsen M., Fridell F., Ottem K.F., Bratland A. & Saether P.A. (2007). Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Archives of Virology* 152: 151–179.

Starliper C.E. (2011) Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research* 2: 97–108

Tidona C.A. and Darai G (1997) The Complete DNA Sequence of Lymphocystis Disease Virus. *VIROLOGY* 230: 207–216

Wenbin Z., Yongqin L., Xiuzhen S., Jing X., Xiaoqian T. (2010) Detection of lymphocystis disease virus in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and other marine teleosts from northern China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* Vol. 28 No. 6: 1213-1220

Wolf K. (1988). *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Zhanga Q., Standish I., Wintersb A.D., Puzach C., Ulferts R., Ziebuhr J., Faisal M. (2014) Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of the fathead minnow nidovirus. *Journal of Virological Methods* 202: 39–45

Κλαουδάτος Σ. και Κλαουδάτος Δ. (2010) Κατασκευές υδατοκαλλιεργητικών συστημάτων. Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα.

Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008) Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα.

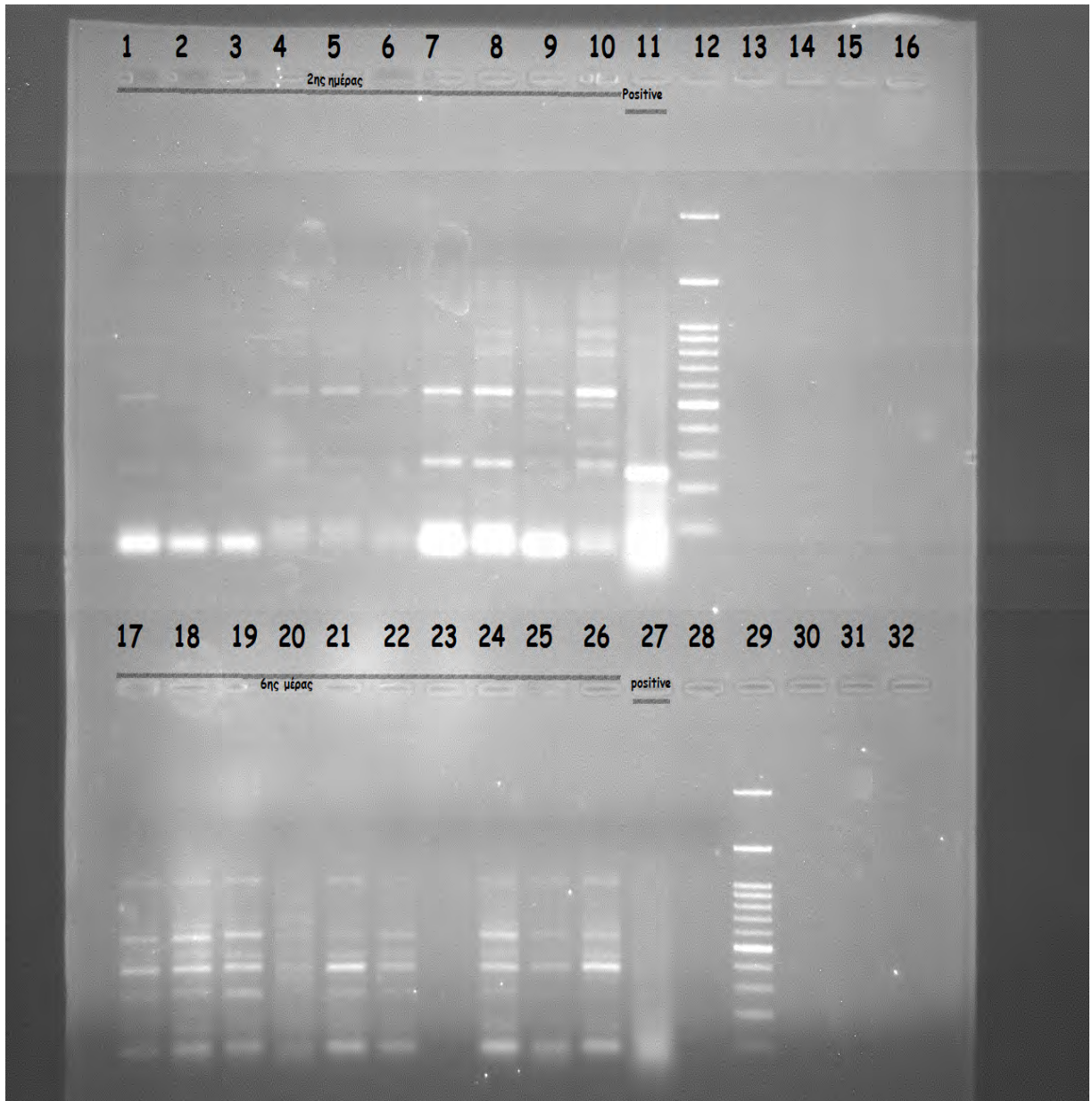
Φώτης Γ.Δ., Αγγελίδης Π.Γ. (2003) Εκτροφή και παθολογία ιχθύων. Σύγχρονη παιδεία, τόμος  
Α: 241-259

### Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

[http:// fishbase.org](http://fishbase.org)

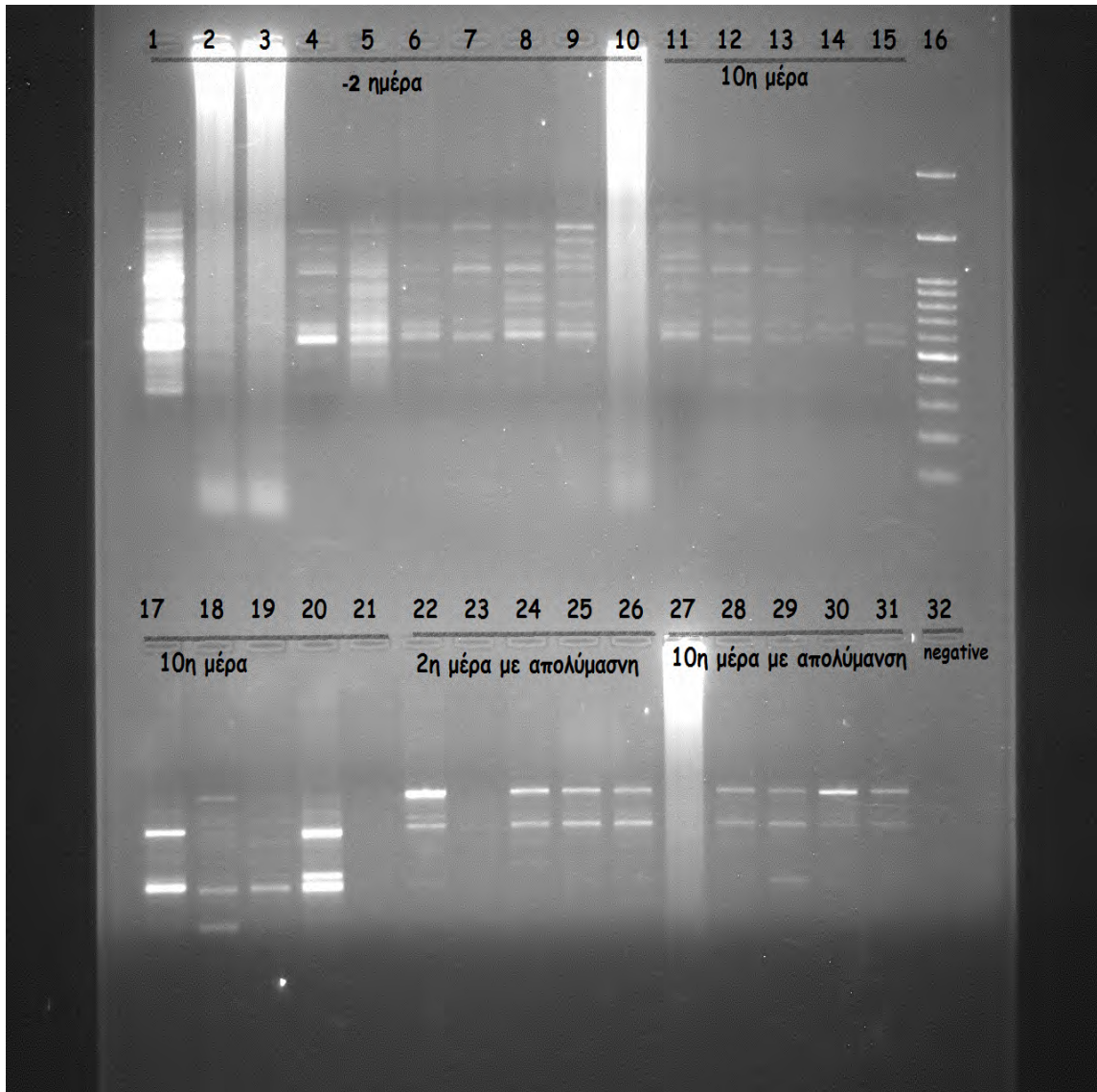
[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/sparus\\_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/sparus_aurata/en)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

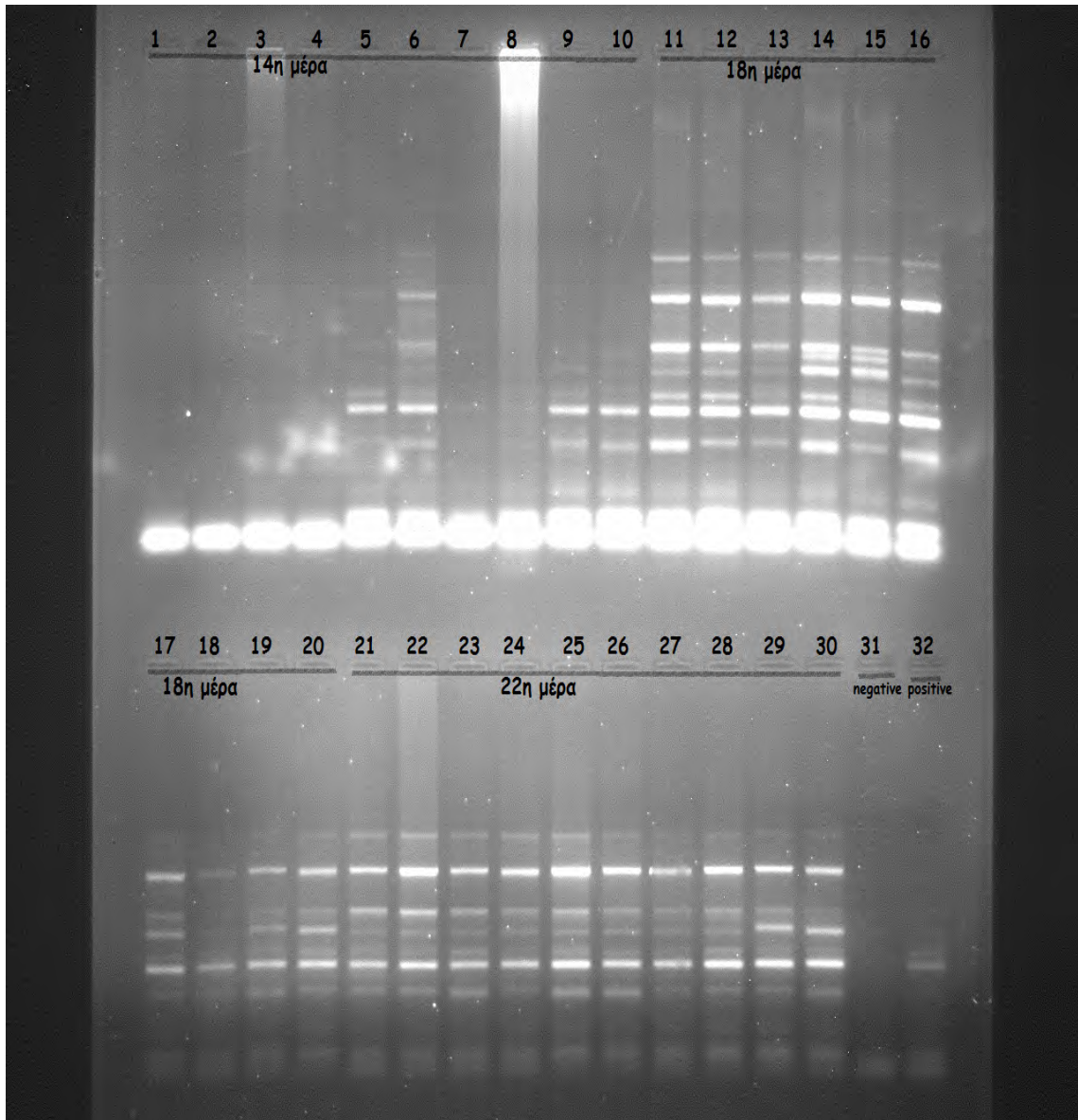


Εικόνα 4: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων 2<sup>ης</sup> και 6<sup>ης</sup> ημέρας.





Εικόνα 5: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων  $-2^{η}$  και  $10^{η}$  ημέρας, καθώς και δείγματα  $2^{η}$  και  $10^{η}$  ημέρας, τα οποία απολυμάνθηκαν.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων 14<sup>ης</sup> , 18<sup>ης</sup> και 22<sup>ης</sup> ημέρας.