



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

---

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»**

**ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

**“Ταυτοποίηση Μυξοβακτηρίων θαλασσινών ειδών ”**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ**

Μάρκος Κολύγας

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Φωτεινή Αθανασοπούλου

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2010



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

---

**POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM**

***“Aquatic Animal Health”***

***IN COLLABORATION WITH  
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS***

**Thesis:**

**“Identification of marine Myxobacteria species ”**

**POSTGRADUATE STUDENT**

Markos Kolygas

**SUPERVISOR**

Foteini Athanassopoulou

KARDITSA 2010

*Διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ και έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας και τοξικολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ.*

*ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣΑ / /2010*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μυξοβακτηρίαση αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για την καλλιέργεια θαλασσινών ειδών, τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Ιαπωνία (Cepeda et al.,2003). Ως κύριος αιτιολογικός παράγοντας στην Μεσόγειο θεωρείται το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* (πρώην *Flexibacter maritimum*)(Avendano- Herrera et al.,2004a). Το θρεπτικό μέσο FMM (*flexibacter maritimum media*) θεωρείται ως επιλεκτικό για το *T. Maritimum*, για τον λόγο αυτό θα συγκριθεί σε πρώτη φάση με το θρεπτικό υπόστρωμα MA το οποίο χρησιμοποιούνταν προγενέστερα για την καλλιέργεια του παθογόνου (Pazos et al.,1996).

Σύμφωνα με τις αναφορές των Suzuki et al.,2001 και Avendano– Herrera et al.,2004c, η ταυτοποίηση μέσω διαφόρων βιοχημικών αναλύσεων δεν αποδίδει ένα σαφές προφίλ για κάθε ένα παθογόνο ξεχωριστά, εντός της ομάδας των Cytophaga-like βακτηρίων. Κάποιες μελέτες ωστόσο κατάφεραν να εντοπίσουν ένα ξεχωριστό βιοχημικό προφίλ για το καθένα, μετά από αύξηση σε αριθμό των ως προς μελέτη βιοχημικών συνιστωσών (Hoon- Kang et al., 2005),( Jung- Kwang et al.,2006), (Frette- Gorgensen et al.,2004),(Vidal et al.,2008),(Choi et al.,2006). Για τον λόγο αυτό, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιούνται οι ίδιες συνιστώσες, με σκοπό την διερεύνηση μιας δυνατής ταξινόμησης των μυξοβακτηρίων μέσω μοναδικών βιοχημικών χαρακτηριστικών.

Τα βιοχημικά τεστ API20E, API20NE, API ZYM και API50CH υπέδειξαν ασαφές βιοχημικό προφίλ του παθογόνου. Η μοριακή διαγνωστική μέθοδος ήταν ανώτερη με το πρωτόκολλο του Toyama να λειτουργεί άψογα, καταφέροντας να ανιχνεύσει 11 από τα 15 στελέχη, με το μοριακό προφίλ του παθογόνου να είναι ομοιογενές εντός του ελλαδικού χώρου. Τα θρεπτικά υποστρώματα MA και FMM κατάφεραν να καλλιεργήσουν το παθογόνο υποδεικνύοντας παρόμοια δυναμική καλλιέργειας.

## ABSTRACT

*Marine Myxobacteriosis is an important disease for several cultured marine fish in Europe and Japan. The main causative agent within the Mediterranean waters is considered to be the bacterium Tenacibaculum maritimum (form. Flexibacter maritimus). FMM (Flexibacter maritimus Media) is the only selective nutritious substrate media for the cultivation of Tenacibaculum maritimum and for this reason will be compared with MA (Marine agar) which was previously used for the cultivation of this pathogen.*

*According to authors Suzuki (2001) and Avendano- Herrera (2004c), identification of bacteria, within the Cytophaga-like bacteria group, through several biochemical tests is insufficient. However later studies succeeded to locate unique biological constituents for many of such bacteria simply by increasing the number of the biochemical tests. For this reason the current thesis investigates the potential identification of Myxobacteria through specific biochemical trials.*

*After several trials with API20E, API20NE, API ZYM and API50CH the biochemical profile of the pathogen were insufficient. The molecular diagnostic technique were superior and indicated that the PCR protocol of Toyama 1996 is reliable, managing to amplify 11 out of total 15 bacterial strains, with the biochemical and molecular profile of the pathogen to be congener inside the Greek area. Selective media MA and FMM cultivated successfully the pathogen by giving nearly the same results.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επόπτρια καθηγήτρια μου  
Δρ. Φωτεινή Αθανασοπούλου για την βοήθεια και την καθοδήγηση της*

*Ευχαριστώ τον Δρ Παππά Ιωάννη για τις εξειδικευμένες γνώσεις του πάνω στα θέματα  
τεχνικών απομόνωσης γενετικού υλικού καθώς και τον Δρ. Μαυρίδη Σάββα για την  
εργαστηριακή καθοδήγηση και εποπτεία*

*Τέλος ευχαριστώ τον Δόκτορα Κανέλλο Θεοφάνη Διευθυντή του τομέα φαρμακευτικών ερευνών  
και τεχνολογίας φαρμάκων Κατοικίδιων ζώων  
της Βρετανικής φαρμακοβιομηχανίας **Pfizer®**  
για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του*

# Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1.1 Εισαγωγή .....	9
1.2 Μυξοβακτηριδίαση.....	10
1.3 Αιτιολογικός Παράγοντας.....	11
1.4 Ευπάθεια Φορέων και Ξενιστές .....	12
1.5 Ποικιλία Στελεχών .....	14
1.7 Κινητικότητα.....	16
1.8 Μέθοδοι Διάγνωσης .....	17
1.8.1 Καλλιέργεια.....	18
1.8.2 Βιοχημικές Διαγνωστικές Μέθοδοι .....	19
1.8.3 Μοριακές Διαγνωστικές Μέθοδοι .....	20
1.9 Θεραπεία - Πρόληψη.....	21
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	25
2.1 Σκοπός .....	25
2.2 Συλλογή Δειγμάτων.....	26
2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων .....	28
2.2.2 Κριτήρια αποδοχής/ απόρριψης των δειγμάτων .....	28
2.3 Καλλιέργεια – Ανακαλλιέργεια στελεχών .....	30
2.4 Βιοχημικές αναλύσεις.....	32
2.4.1 API 20 E.....	33
2.4.2 API 20NE.....	34
2.4.3 API 50CH.....	35

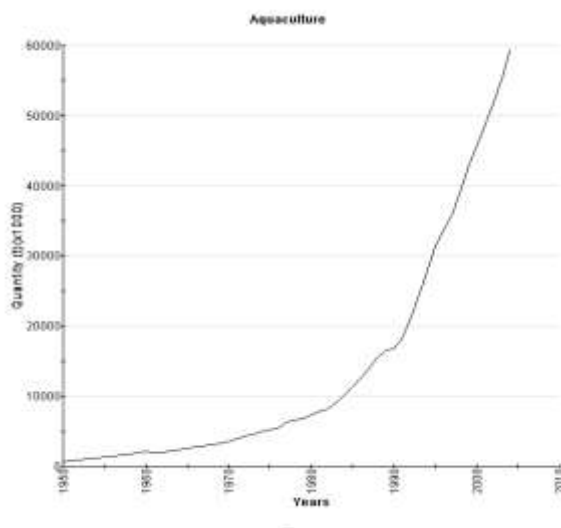
2.4.4 API ZYM .....	36
2.5 Απομόνωση Γενετικού υλικού .....	36
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση βακτηρίων <i>Tenacibaculum maritimum</i> .....	39
2.6.1 Ηλεκτροφόρηση των DNA αμπλικονίων (PCR) .....	40
2.7 Αποτελέσματα .....	43
2.7.1 Καλλιέργεια στελεχών .....	43
2.7.2 API 20 E.....	48
2.7.3 API 20 NE.....	49
2.7.3 API ZYM .....	50
2.7.4 API 50 CH.....	51
2.8 Συμπεράσματα .....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	56



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Εισαγωγή

Η ιστορία της εντατικής καλλιέργειας για διάφορα είδη θαλάσσιων οργανισμών, άρχισε να γράφεται στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Με την καταναλωτική ζήτηση να αυξάνεται ολοένα (πίνακας 1), η αναγκαιότητα της σταθερούς παροχής θαλασσίων πρώτων υλών με χαμηλό κόστος παραγωγής ανάγκασε στην δημιουργία ενός κλίματος ραγδαίας βιοτεχνολογικής ανάπτυξης. Έτσι, για το σύγχρονο κόσμο των υδατοκαλλιεργειών ο όρος εντατικοποίηση



**Πίνακας 1.** Ετήσια παράγωγή παγκοσμίως σε τόνους x 1000 σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του FAO

αποτελέσει νόρμα και τον κανόνα για να εξασφαλιστεί ο ανταγωνισμός και η βιωσιμότητα του.

Στην εντατική καλλιέργεια όμως η διάδοση των ασθενειών στα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας είναι συχνότερη και αυτό εξαιτίας του μεγάλου βαθμού εντατικοποίησης. Παρόλο που οι μέθοδοι διαχείρισης έχουν βελτιωθεί, τα βακτηριακής και ιογενούς φύσεως νοσήματα έχουν ανακύψει ως ένα σοβαρό πρόβλημα για τα περισσότερα εκτρεφόμενα είδη. Οι

βακτηριακές ασθένειες είναι υπεύθυνες για υψηλές θνησιμότητες τόσο στην φύση όσο και στις υδατοκαλλιέργειες. Οι περισσότεροι από τους αιτιολογικούς μικροοργανισμούς είναι κάποια σαπρόφυτα των οποίων η παρουσία είναι φυσιολογική, και κατέχουν ουσιαστικό ρόλο ως αποικοδομητές στο θαλάσσιο περιβάλλον. Χρησιμοποιούν οργανική ύλη και μέταλλα για να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν (Robert 2003). Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι κυρίως ευκαιριακά παθογόνα όπου καταλαμβάνουν τους ιστούς των ψαριών υποβαθμίζοντας την υγεία τους τόσο έμμεσα όσο και άμεσα (Allen et al.,1983). Ορισμένα είδη βακτηρίων ωστόσο εντοπίζονται αυστηρώς στα ψάρια.

## 1.2 Μυξοβακτηριδίαση

Η μυξοβακτηρίαση ή στηλώδης νόσος συναντάται στην ξένη βιβλιογραφία με διάφορα ονόματα όπως salt water columnaris disease, marine Tenacibaculosis, gliding bacterial disease, EMS (eroded mouth necrosis), BPN (black patch necrosis), Myxobacterial disease, peduncle disease, Saddleback, Fin rot και Cotton wool Disease (Noga 2000).

Προέκυψε αρχικά ως ασθένεια σε γόνο τσιπούρας, πλέον όμως αποτελεί περιοριστικό παράγοντα εκτροφής και πολλών άλλων ειδών σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης, της Αμερικής και της Ιαπωνίας (Pazos et al., 1999). Σε κάποιες περιοχές η εκδήλωση ή όχι της νόσου καθορίζει κάθε φορά και την τιμή διάθεσης στην αγορά των ψαριών και αυτό γιατί σε πολλές περιπτώσεις οι θνησιμότητες μπορεί να είναι μεγάλες.

Το *T. maritimum* είναι υπεύθυνο για την Μυξοβακτηρίαση. Πρόκειται για Gram αρνητικό βακτήριο όπου σχηματίζει μακριά και λεπτά ραβδονημάτια (0.5μm επί 2-30μm). Σε παλιές καλλιέργειες, τα κύτταρα είναι μικρότερα με σφαιρική δομή διαμέτρου 0.5μm (Pazos et al., 1999). Είναι υποχρεωτικώς αερόβιο βακτήριο με απουσία μικροκυστών και χαρακτηριστική ολισθητική ικανότητα (Pazos et al., 1999).

### 1.3 Αιτιολογικός Παράγοντας

Το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της μυξοβακτηρίασης στα θαλασσινά ψάρια (Pazos et al., 1999). Το παθογόνο απομονώθηκε για πρώτη φορά από γόνο *madai* (ιαπωνικό φαγκρί) στην Ιαπωνία, το οποίο και χαρακτηρίστηκε μετέπειτα από τον Wakayabashi et al., 1986), ο οποίος επικύρωσε το βακτήριο με την ονομασία *Flexibacter maritimus*. Τα ονόματα *Cytophaga marina* και *Flexibacter marinus* χρησιμοποιούνταν πριν από το 1986 για να περιγράψουν το παθογόνο (Pazos et al., 1999). Το 2001 προτάθηκε η μεταφορά των *Flexibacter maritimus*, *F. amylolyticum*, *F. Onolyticum* και *F. Mesophylum* στο γένος *Tenacibaculum* (Suzuki et al., 2001). Το χαρακτηριστικό του γένους αυτού είναι η ύπαρξη μενακινόνης-6 στο γονίδιο της γυράσης-B (*gyrB*), η οποία εντοπίστηκε και στα τέσσερα προαναφερθέντα είδη. Το γένος *Tenacibaculum* ανήκει στην φυλογενετική ομάδα των θαλάσσιων MK-6 ειδών σύμφωνα με τις επίσημες ταξινομικές λίστες (Suzuki et al., 2001).

Τα μυξοβακτήρια κατά καιρούς περιγράφονταν ως *Sporocytophaga* spp. Παρόλα αυτά, η παρουσία μικροκυστών (κύριο διαγνωστικό στοιχείο αυτού του γένους) δεν μπορούσε να εντοπιστεί (Woo 2000). Ο Davis για πρώτη φορά το 1922 εντόπισε μυξοβακτήρια σε ψάρια γλυκού νερού και τους έδωσε την ονομασία *Bacillus columnaris* από την κιονοειδή δομή που σχημάτιζαν τα βακτηριακά συνονθυλεύματα στους ιστούς. Οι Ordal και Rucker (1944) επέτυχαν για πρώτη φορά να απομονώσουν τον αιτιολογικό παράγοντα της ασθένειας. Βάση μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών το εκχώρησαν στην οικογένεια των *Myxococcaceae* και μετονόμασαν το βακτήριο σε *Chondrococcus columnaris*. Η Garnjobst (1945) παρατήρησε την απουσία μικροκυστών και πρότεινε την μετονομασία του βακτηρίου σε *Cytophaga columnaris*, πράγμα που όμως δεν έγινε δεκτό. Κατά τις δεκαετίες 70-80 τα μυξοβακτήρια (άνευ μικροκυστών) εντάσσονταν στην τάξη *Cytophagales* χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρή η ταξινομική τους υπόσταση καθώς οι διαφορές μεταξύ των γενών *Flexibacter* και *Cytophaga* παρέμεναν συγκεχυμένες (Bernardet et

al., 1986). Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα ήταν η φαινοτυπική ομοιότητα με βακτήρια του γένους *Flavobacterium*. Η σύγχυση προέκυπτε από το γεγονός πως ορισμένα βακτήρια που εντοπίζονταν σε ψάρια του γλυκού νερού μπορούσαν να ανεχθούν μικρές συγκεντρώσεις σε NaCl, κατά την καλλιέργεια τους σε θρεπτικά υποστρώματα. Έτσι προέκυψε η πεποίθηση πως παρόμοιες εκδηλώσεις σε ψάρια θαλασσινού νερού είναι αποτέλεσμα του *Flexibacter columnaris* (Bernardet et al., 1990). Το 1986 ο Wakayabashi (1986) πρότεινε την μετονομασία των θαλασσινών μυξοβακτηρίων σε *Flexibacter maritimus*, θέτοντας αυτόματα και έναν φραγμό στην σύγχυση που επικρατούσε ως τότε. Το 2001 το γένος μετονομάστηκε σε *Tenacibaculum* από τον Suzuki (2001) και υπό αυτήν την ονομασία χαρακτηρίζεται έως και σήμερα.

## 1.4 Ευπάθεια Φορέων και Ξενιστές

Το *T. maritimum* δεν χρησιμοποιεί εξειδικευμένους ξενιστές. Τόσο τα ενήλικα άτομα όσο και οι λάρβες είναι ευπαθείς στην μυξοβακτηρίαση, παρόλα αυτά, τα πιο νεαρά ψάρια φαίνεται πως είναι περισσότερο ευαίσθητα στην ασθένεια. Μπορούν να επιβιώσουν στο υδάτινο περιβάλλον για αρκετό καιρό, όμως δεν μπορούν να αναπαραχθούν μακριά από τους ξενιστές τους. Ο παρασιτισμός μπορεί για κάποιο εύλογο χρονικό διάστημα να μην επηρεάσει τον ξενιστή όμως συνήθως μετά από κάποιες σημαντικές αλλαγές στην φυσιολογία του ατόμου η ασθένεια εκδηλώνεται. Η δυνητικότητα της νόσου ενισχύεται από περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες (Roberts 2001).

Ο τρόπος της μετάδοσης και μόλυνσης της ασθένειας είναι ακόμα απροσδιόριστος. Οι φυσικές δεξαμενές του παθογόνου είναι άγνωστες αλλά το βακτήριο έχει απομονωθεί τόσο από το νερό όσο και από τη λάσπη της θάλασσας (Choi et al.,2006; Jung- Kwang et al.,2006)

Παρατηρείται συχνότερη παρουσία του βακτηρίου σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 15<sup>0</sup>C, ενώ αυξάνεται παράλληλα και η δριμύτητα της νόσου (Pazos et al., 1999). Νερά με υψηλό οργανικό φορτίο, κανιβαλισμός, μεγάλες αλλαγές στην θερμοκρασία, υψηλή ιχθυοφόρτιση, μεταφορές και χειρισμοί αποτελούν

φυσικοχημικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες οι οποίες ενισχύουν την εκδήλωση της ασθένειας. Τέτοιες παράμετροι είναι συνήθεις στα συστήματα υδατοκαλλιεργειών (Roberts 2001).

Στην **Ευρώπη**, το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* έχει απομονωθεί από γλώσσες (*Solea solea*; *Solea senegalensis*), λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*), τσιπούρα (*Sparus aurata*), κέφαλο (*Mugil cephalus*), ιαπωνικό φαγκρί (*Pagrus major*), μεσογειακό φαγκρί (*Pagrus pagrus*), μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*), Συναγρίδα (*Dentex dentex*), μυλοκόπι (*Umbrina cirrosa*), καπόνι-χελιδονά (*Chelidonichthys lucernus*), καλκάνι (*Scophthalmus maximus*), σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) και από τον σολομό coho (*Oncorhynchus kisutch*). Στην **Ιαπωνία** η ασθένεια αναφέρθηκε σε ιαπωνικό φαγκρί (*Pagrus major*), (*Acanthopargus schlegeli*), ψευδόγλωσσα (*Paralichthys olivaceous*), μαγιάτικο (*Seriola quinqueradiata*), σαργό (*Diplodus sargus*) και μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*). Στην **Αμερική** απομονώθηκε από σκίαϊνα (*Atractoscion nobilis*),σαρδέλα του Ειρηνικού (*Sardinops sagax*), αντζούγιες (*Engraulis mordax*) και το είδος *Oplegnathus fasciatus*. Στην **Αυστραλία** η πρώτη μεγάλη εκδήλωση της ασθένειας έγινε το 1988/89 σε κλουβιά εκτροφής σολομού (*Salmo salar*). Έκτοτε αναφέρθηκαν μαζικές μολύνσεις κυρίως σε θαλάσσιες εγκαταστάσεις εκτροφής με σημαντικές απώλειες. Πειραματικές μολύνσεις σε πρασινόγλωσσα (*Rhombosolea tapirina*) υπέδειξαν μικρή ευαισθησία στο παθογόνο (Avendano- Herrera et al., 2004b,2005; Gelderen et al., 2009; Magi et al., 2006; Pazos et al., 1999; Salati et al., 2005; Soltani et al.,1996; Toranzo et al., 2005; Wakabayashi et al.,1986).

Στην Σκωτία και στην Μ. Βρετανία υπήρξαν περιστατικά σημαντικών θνησιμοτήτων σε σολομούς κλουβιών, οι οποίες συνέπεσαν χρονικά με την παρουσία μικρών μεδουσών στην περιοχή της μονάδας πάχυνσης (Ferguson et al., 2009), Οι μέδουσες αυτές (*Phialella quardata*) ως ασυμπτωματικοί φορείς, πέρασαν μέσα στα κλουβιά των σολομών εκδηλώνοντας τους την ασθένεια, η οποία εστιαζόταν κυρίως στα βράγχια προκαλώντας εκτεταμένη νέκρωση και θρόμβους.

## 1.5 Ποικιλία Στελεχών

Μέχρι και το 1999 το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* θεωρούνταν βιοχημικά ομοιογενές (Ostland et al., 1999). Την τελευταία δεκαετία όμως έχουν ανιχνευθεί τουλάχιστον τρεις ορότυποι (**O**) (Avendano- Herrera et al.,2004a). Σε αυτούς τους ορότυπους έχει εντοπιστεί εξειδίκευση φορέων δηλαδή συγκεκριμένα ήδη ψαριών είναι μολυσμένα με συγκεκριμένο ορότυπο του παθογόνου και vice versa (Avendano –Herrera et al.,2004a). Η πλειονότητα των παθογόνων που απομονώθηκε από την γλώσσα (*Solea solea*) και την τσιπούρα (*Sparus aurata*) χαρακτηρίζεται από όμοιο ορότυπο (**O<sub>1</sub>**), ωστόσο, διαφορετικό από εκείνο (**O<sub>2</sub>**) του καλκανιού (*Scophthalmus maximus*)( Toranzo et al.,2005) και εκείνου (**O<sub>3</sub>**) που απομονώθηκε στο καπόνι (*Chelidonichthys lucernis*) (Magi et al.,2006). Αυτή η αντιγονική ετερογένεια θα μπορούσε να αποτελεί έναν επιδημιολογικό δείκτη για αυτά τα είδη ψαριών. Την ενδοειδική αυτή γενετική μεταβλητότητα του *T. maritimum* έχουν υποδείξει αναλύσεις με RAPD-PCR ανεξαρτήτως της αλληλουχίας των ειδικών εκκινητών (Toranzo et al.,2005). Αυτά τα στελέχη μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις διαφορετικές ταξινομικές ομάδες συνδυαζόμενα με τους ξενιστές ή/και τους ορότυπους τους (Avendano- Herrera et al.,2004b). Όμως, παρά την σύμφωνη καθομολογία απόψεων για την ύπαρξη αυτών των ορότυπων, παρατηρούνται ασυμφωνίες πάνω στο θέμα, πιθανότατα εξαιτίας των διαφορετικών αντιγόνων και αντιωρών όπου χρησιμοποιήθηκαν από τους διάφορους ερευνητές (Ostland et al., 1999; Pazos et al.,1997; Santos et al., 1999).

Η λεπτομερής έρευνα των αντιγόνων του *T. maritimum* είναι σημαντική τόσο από επιδημιολογικής πλευράς, όσο και από πλευράς γνώσεων, ικανών ώστε να προκύψουν αποδοτικά εμβόλια. Υπογραμμίζεται λοιπόν η αναγκαιότητα για περαιτέρω μελέτες πάνω στον συσχετισμό μεταξύ των διαφόρων αντιγονικών ομάδων και των ξενιστών ή/και της γεωγραφικής κατανομής του βακτηρίου (Avendano – Herrera et al.,2004a).

## 1.6 Κλινική Εικόνα

Τα προσβεβλημένα σε μυξοβακτηρίαση άτομα (νεαρά ή ενήλικα) παρουσιάζουν ελκωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, και νεκρωτικές διαβρώσεις στα πτερύγια και την ουρά. Η μόλυνση γίνεται μέσω των εξωτερικών επιφανειών του ψαριού (Magarinos et al., 1995). Στα νεαρά παρατηρείται ερυθρότητα του στόματος με παράλληλη αιμορραγία στις γνάθους που καλύπτονται από ένα παχύ στρώμα ωχροκίτρινης βλέννας (Avendano Herrera et al., 2004a). Οι διαβρώσεις μπορεί να είναι μικρές ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και σκούρος χρωματισμός από την βάση του ουραίου πτερυγίου έως και τα άκρα των ακτινών του πτερυγίου. Σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται εστιακή νέκρωση στα βράγχια μαζί με υπερβολική παραγωγή βλέννας (Pazos et al., 1999).

Ανάλογα με την λοιμογόνο δύναμη του βακτηριακού στελέχους προκαλείται χρόνια ή οξεία νόσος. Κατά την οξεία μορφή δεν παρατηρούνται εμφανή εξωτερικά συμπτώματα και αλλοιώσεις αλλά η εξέλιξη της νόσου είναι γρήγορη και παρατηρούνται θάνατοι (Schaperclaus 1992). Εξαιτίας των ελκωτικών διαβρώσεων στην επιφάνεια του σώματος του ξενιστή, συναντάται συνήθως και ως μεικτή μόλυνση καθώς προκύπτουν δευτερεύουσες βακτηριακές επιμολύνσεις π.χ. από *Vibrio spp.* και διάφορα βλεφαριδοφόρα βακτήρια (Avendano- Herrera et al., 2004a; Devesa et al., 1989). Η λοίμωξη εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια των ψαριών στο δέρμα και στα βράγχια. Μερικές φορές είναι δυνατόν να προσβληθούν και εσωτερικά όργανα τα οποία παρουσιάζουν έντονη φλεγμονή.

Έχει παρατηρηθεί πως πάνω από το 60% των θνησιμοτήτων στο μεταλαρβικό στάδιο, σε εκκολαπτήρια γαρίδας κυρίως του είδους *Litopenaeus vannamei*, συσχετίζονται με την παρουσία μεγάλων αριθμών ραβδόμορφων βακτηρίων. Οι νεκρές λάρβες παρουσιάζουν αλλοιώσεις σε διάφορα μέρη του σώματος, αποχρωματισμό των βραγχίων, δυσμορφισμό των προσαρτημάτων και της γαστρικής χώρας. Οι επιζήσασες λάρβες, εκτός από τις προαναφερόμενες αλλοιώσεις, παρουσιάζουν επίσης μείωση στην αύξηση, στην μεταμόρφωση, την κινητικότητα και στην όρεξη (Mourino et al., 2008).

Σύμφωνα με την μελέτη του Mourino et al., (2008), το παθογόνο βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* είναι υπεύθυνο για αυτές της απώλειες στο μεταλαρβικό

στάδιο της γαρίδας *Litorpnaeus vannamei*, προκαλώντας την παραπάνω κλινική εικόνα. Ωστόσο τα αποτελέσματα της μελέτης είναι διφορούμενα (Avendano- Herrera et al., 2008), γεγονός που αφήνει αμφιβολίες για τον εάν τελικά το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* προσβάλλει το συγκεκριμένο είδος γαρίδας.

## 1.7 Κινητικότητα

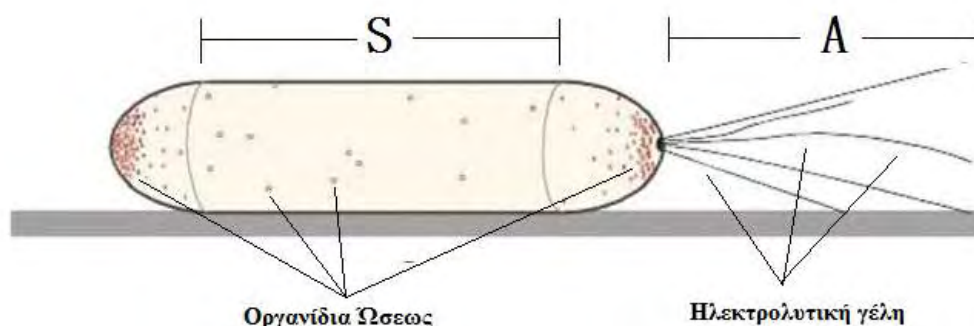
Η ικανότητα κίνησης των μυξοβακτηρίων αποτελεί ακόμη και σήμερα μυστήριο, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο ιθύνων βιολογικός μηχανισμός. Κάτω από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο τα μυξοβακτήρια παρουσιάζουν μια ολισθητική κίνηση χαρακτηριζόμενη ως οφιοειδής (Spormann et al., 1999), η οποία έχει ταχύτητα περί τα 4-8μm/min (Wakabayashi et al., 1986). Στα ανακαλλιεργούμενα στελέχη περιορίζεται τόσο η ταχύτητα όσο και το σχήμα των βακτηρίων (Avendano-Herrera et al., 2004b). Η μετακίνηση επιτυγχάνεται χωρίς την ύπαρξη κάποιου ουραίου εξαρτήματος (μαστιγίου ή νηματίου), ως μηχανισμός προώθησης του βακτηρίου. Αντί αυτού, η κίνηση προκύπτει από το ίδιο το βακτήριο μέσω δύο διαφορετικών, αλλά διακριτών μεταξύ τους, μηχανισμών κίνησης. Ο πρώτος τύπος κίνησης ονομάζεται **A (adventurous)** και ο δεύτερος **S (social)** (Kaiser et al., 2000), με τους δύο αυτούς τύπους κινήσεων να εντοπίζονται συνεργικά στα μυξοβακτήρια. Τα  $A^-S^-$  βακτήρια δεν είναι κινητά, και η μετατόπιση τους δεν ξεπερνά το  $\frac{1}{4}$  του κυτταρικού μήκους. Τα  $A^-S^+$  και τα  $A^+S^-$  βακτήρια είναι κινητά, πάραυτα, η σημουργία των δομών και των αναλογιών τους διαφέρει σημαντικά από τα  $A^+S^+$  βακτήρια στα οποία εντάσσονται και τα μυξοβακτήρια μετά από μελέτη στην κίνηση των μυξοβακτηρίων του είδους *M. xanthus* (Hodgkin και Kaiser et al., 1979).

Η θεωρία που έχει αναπτυχθεί από έρευνες σχετικά με την κινητικότητα αυτών των βακτηρίων, υποδεικνύει τους πιθανούς κυτταρικούς μηχανισμούς που πυροδοτούν αυτές τις αντιδράσεις στην κίνηση. Η κίνηση **S** προκύπτει από σμήριγγες τύπου IV (pili IV) που θεωρείται πως προεκτείνονται, συνδέονται των γειτονικών κυττάρων και μετά απότομα συστέλλονται, τραβώντας τα κύτταρα μεταξύ τους (Kaiser et al., 2000). Η pilT έχει θεωρηθεί η εναρκτήρια πρωτεΐνη της σύσπασης των σμηριγγών (Merz et al., 2000). Η θεωρία της κίνησης **A** είναι λιγότερο σαφής και



υποδεικνύει κάποια οργανίδια ώσεως παρομοιαζόμενα με ακροφύσια που εντοπίστηκαν στα Κυανοβακτήρια ως υπεύθυνα αυτού του τύπου κίνησης (Hoiczky et al., 2000). Γενικότερα για τον τύπο A, η βλέννα που εκκρίνεται από τα οργανίδια αυτά, συνδέεται με το φαινόμενο της ελαστικοταξίας (Sportmann et al., 1999) οπότε και αποτελεί πιθανώς το μέσο που καθορίζει την κατεύθυνση του βακτηρίου. Με τον όρο ελαστικοταξία χαρακτηρίζεται η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων στο να αντιλαμβάνονται και να αντιδρούν στις ελαστικές δυνάμεις που ασκούνται από το υπόστρωμα προς τις βακτηριακές τους μάζες.

Η σύσταση της βλέννας δεν είναι στο σύνολο της γνωστή. Ένα μεγάλο μέρος της ωστόσο αποτελείται από πολύ-ηλεκτρολυτική γέλη. Οι δυνάμεις οσμωτικής πίεσης όπου αναπτύσσονται από τα οργανίδια ώσεως καθώς εκκρίνουν την βλέννα, προκαλούν την διαστολή της βλεννώδους μάζας η οποία σπρώχνει το βακτήριο προς τα εμπρός. Τέτοια οργανίδια ώσεως εντοπίζονται σε όλο τον κορμό του βακτηρίου με την πλειονότητα να βρίσκεται στους πόλους. Καθώς η βλέννα συναντά το εξωτερικό, υδάτινο, υποτονικό περιβάλλον, μέρος αυτού εισέρχεται μέσα της και προκαλεί την διαστολή της οσμωτικά (Wongmuth et al., 2002).



Εικόνα 1. Σχηματική παρουσίαση των μηχανισμών κίνησης των μυξοβακτηρίων. Η κίνηση S προκύπτει από σύσπαση των σμηριγγών τύπου IV καθώς αυτές συνδέουν γειτονικά κύτταρα μεταξύ τους. Ο μηχανισμός εντοπίζεται στον κορμό του βακτηρίου. Η κίνηση A προκύπτει από οργανίδια ώσεως τα οποία εκκρίνουν βλέννα όπου οσμωτικά, διαστέλλεται εκτοπίζοντας το κύτταρο. Τα οργανίδια ώσεως είναι διακριτά σε όλη την επιφάνεια του βακτηριακού μορφώματος αλλά πληθαίνουν στους πόλους εκατέρωθεν. Wolgemuth et al., 2002. Το σχήμα έχει υποστεί μετατροπές για την εξυπηρέτηση του αναγνώστη.

## 1.8 Μέθοδοι Διάγνωσης

Η κλινική εικόνα μαζί με την μικροσκοπική εξέταση είτε νωπών παρασκευασμάτων είτε παρασκευασμάτων μετά από χρώση Gram από τις επιδερμικές αλλοιώσεις των ψαριών, αποτελούν το πρώτο βήμα διάγνωσης της νόσου. Αυτή η αρχική διάγνωση μπορεί να υποστηριχθεί και με άλλες ορολογικές τεχνικές όπως ο φθορισμός αντισωμάτων (Pazos et al., 1999). Η απομόνωση του παθογόνου και η εξέταση του βιοχημικού του προφίλ μπορούν να επαληθεύσουν την διάγνωση (Pazos et al., 1999). Ωστόσο για βακτήρια που εντάσσονται στις ομάδες Cytophaga- Flavobacteria- Myxobacteria είναι προτιμότερη η ταυτοποίηση μέσω βιολογικών τεχνικών απομόνωσης γενετικού υλικού για σαφή συμπεράσματα.

### 1.8.1 Καλλιέργεια

Το *Tenacibaculum maritimum* μπορεί να αναπτυχθεί σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα όπως: Anacker & Ordal agar (Pazos et al., 1999), FMM (Pazos et al., 1993), MA (θαλάσσιο άγαρ) και Hsu-Shotts agar (+50% θαλασσινό νερό) (Chen et al., 1995). Η επώαση γίνεται στους 25<sup>0</sup>C – 30<sup>0</sup>C για 24-72 h. Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, οι αποικίες είναι ομοιόμορφα επίπεδες, ωχροκίτρινες και λεπτές με άνισες προεκτάσεις, ενώ σε στατικό υγρό θρεπτικό υπόστρωμα η επιφάνεια ανάπτυξης έχει την μορφή υμένα (Pazos et al., 1999).

Στα περισσότερα media οι αποικίες έχουν τα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν (ομοιόμορφα επίπεδες, ωχροκίτρινες λόγω ζεαξανθίνης και λεπτές με άνισες προεκτάσεις), ενώ στο MA (θαλάσσιο άγαρ) οι αποικίες είναι στρογγυλές και κίτρινες (Pazos et al., 1999). Το θρεπτικό υπόστρωμα FMM είναι το πιο αποτελεσματικό για την καλλιέργεια του *T.maritimum* (Avendano- Herrera et al., 2005;Pazos et al., 1996). Σύμφωνα με την NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), προτείνονται δύο πρωτόκολλα θρεπτικών υποστρωμάτων που

έχουν ως βάση το Mueller- Hinton άγαρ (dMHA) για την απομόνωση του βακτηρίου *T. Maritimum* (NCCLS 2003). Η επιλεκτικότητα αυτού του υποστρώματος ωστόσο αμφισβητείται καθώς σε πολλές περιπτώσεις έχει αποτύχει η in vitro καλλιέργεια του παθογόνου (Avendano- Herrera et al., 2005).

Για να προκύψει η ανάπτυξη του παθογόνου είναι αναγκαία η χρήση θαλασσινού νερού στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το διάλυμα NaCl ως αντικαταστάτης του θαλασσινού νερού δεν ενδείκνυται αν και μαζί με το KCl αποτελούν αναγκαία άλατα για την καλλιέργεια του *T. Maritimum* (Pazos et al., 1999). Σε συνθήκες εργαστηρίου ωστόσο είναι δυνατή η αντικατάσταση του θαλασσινού νερού με διάλυμα (4%; wt/vol) θαλασσινών αλάτων τα οποία κυκλοφορούν στο εμπόριο (Avendano- Herrera et al., 2005). Παράλληλα προτείνονται χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών αλάτων εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης που τα χαρακτηρίζει (Toranzo et al., 2005). Τα δισθενή ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  βοηθούν στην ανάπτυξη των βακτηρίων, ενώ τα ανιόντα  $SO_4^{2-}$  λειτουργούν περιοριστικά (Wakabayashi et al., 1986). Γενικά, ανάπτυξη στο υπόστρωμα μπορεί να παρατηρηθεί σε θερμοκρασίες από 15<sup>0</sup>C έως 34<sup>0</sup>C, ωστόσο οι 30<sup>0</sup>C αποτελούν ιδανική θερμοκρασία για την καλλιέργεια του παθογόνου (Suzuki et al., 2001).

## 1.8.2 Βιοχημικές Διαγνωστικές Μέθοδοι

Το βιοχημικό προφίλ αποτελεί ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση ενός παθογόνου. Στην περίπτωση του *T. Maritimum* έχουν γίνει προσπάθειες από διάφορους ερευνητές για τον χαρακτηρισμό του παθογόνου μέσω ενός μοναδικού βιοχημικού προφίλ από το οποίο θα είναι ικανή η ταυτοποίηση του βακτηρίου (Bernardet – Grimont et al., 1989; Chen et al., 1995; Wakabayashi et al., 1986). Ωστόσο, παρά την αρχική ομοιογένεια σε αυτά τα προφίλ μεταξύ των διαφόρων απομονωθέντων στελεχών, πρόσφατες έρευνες μεγαλύτερης ενδελέχειας μέσω μοριακών και ορολογικών τεχνικών, υπέδειξαν την ύπαρξη διαφορετικών ορότυπων μεταξύ του *T. maritimum* (Avendano- Herrera et al., 2004a). Το *Tenacibaculum maritimum* δεν υδρολύει το άγαρ, την κυτταρίνη και την χιτίνη (Pazos et al., 1999). Είναι θετικό καταλάσης, οξυδάσης και απορροφά το κόκκινο του Congo (Avendano-

Herrera et al., 2004a). Μειώνει τα νιτρικά και δεν παράγει υδρόθειο (H<sub>2</sub>S)(Bernardet et al., 1990; Ostland et al., 1999), ωστόσο είναι πιθανό για ορισμένα στελέχη του *T. maritimum* να μην παρατηρηθεί μείωση στα νιτρικά και να είναι θετικά σε υδρόθειο (Avendano- Herrera et al.,2004a; Chen et al., 1995). Η μέση τιμή του αθροίσματος Γουανίνης- Κυτοσίνης(G+C) στο DNA κυμαίνεται από 29% - 32.5% (Pazos et al., 1999). Απουσία μικροκυστών (Cepeda et al.,2003). Δεν παράγεται οξύ από γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, μανόζη, λακτόζη, σουκρόζη, σορμπούζη, μαλτόζη, κυτταροβιόζη, τριαλόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, ραφινόζη, δεξτρίνη, γλυκογόνο, ινουλίνη, γλυκερόλη, αδονιτόλη, μανιτόλη, ντουλσιτόλη, σορβιτόλη, ινοσιτόλη ή σαλικίνη (Hikida et al.,1979;Wakabayashi et al.,1986).

### 1.8.3 Μοριακές Διαγνωστικές Μέθοδοι

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα για την μελέτη του *T. maritimum* αποτελεί η όχι εύκολη διάκριση του από έτερα φυλογενετικά και φαινοτυπικά, παρόμοια με αυτό, είδη, κυρίως εκείνα των γενών *Flavobacterium* και *Cytophaga* (Suzuki et al.,2001). Η παραδοσιακή μέθοδος διάγνωσης μέσω της καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα και ο μετέπειτα χαρακτηρισμός του βιοχημικού προφίλ του βακτηρίου, αποτελούν τα κύρια βήματα ταυτοποίησης, διαρκούν ωστόσο αρκετές ημέρες έως ότου προκύψει αποτέλεσμα. Ακόμα ένας περιορισμός είναι η δυσκολία να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα καθώς ο μικρός ρυθμός ανάπτυξης που το χαρακτηρίζει δίνει την ευκαιρία σε λοιπά ευκαιριακά βακτήρια να το υποβάλλουν (Avendano- Herrera et al., 2004a). Έτσι, η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων είναι αναγκαία καθώς μειώνεται σημαντικά ο χρόνος διάγνωσης και αυξάνεται η ακρίβεια της ταυτοποίησης.

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι σημαντική για την ακριβή ταυτοποίηση του παθογόνου (Toranzo et al.,2005), αντικαθιστώντας τις παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους. Δύο μελέτες έχουν υποδείξει πρωτόκολλα PCR χρησιμοποιώντας το 16S ριβοσωμικό RNA (rRNA) γονίδιο ως στόχο για την διάγνωση της μυξοβακτηρίωσης (Bader and Shotts et al.,1998;Toyama et al.,1996).

Σύμφωνα με τον Toyama (1996), χρησιμοποιούνται οι εκκινητές **MAR<sub>1</sub>** (5'-AATGGCATCGTTTTAAA-3') και **MAR<sub>2</sub>** (5'-CGCTCTCTGTTGCCAGA-3') από τους οποίους προκύπτει ένα αμπλικόνιο μεγέθους 1088bp. Κατά τους Bader και Shotts (1998) χρησιμοποιούνται οι εκκινητές **Mar<sub>1</sub>** (5'-TGTAGCTTGCTACAGATGA-3') και **Mar<sub>2</sub>** (5'-AAATACCTACTCGTAGGTACG-3') από τους οποίους προκύπτει ένα αμπλικόνιο μεγέθους 400bp. Μια συγκριτική μελέτη των δύο, κατέστησε σαφές πως το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στην μελέτη του Toyama (1996) είναι πιο ικανοποιητικό για την ανίχνευση του *T. Maritimum*, τόσο σε επίπεδο διαγνωστικής παθολογίας όσο και επιδημιολογικών μελετών (Avendano- Herrera et al., 2004b).

Η απλή λήψη βακτηριακού υλικού από την βλέννα της επιδερμίδας τόσο από συμπτωματικούς όσο και από ασυμπτωματικούς φορείς της ασθένειας, χωρίς αυτοί να θανατωθούν, θεωρείται επαρκής βακτηριακή ποσότητα για να διαγνωστεί με μοριακές μεθόδους το παθογόνο (Avendano- Herrera 2004c).

Σύμφωνα με τον Cepeda (2003), ο χρόνος ταυτοποίησης μπορεί να μειωθεί στις 4h από την στιγμή της απομόνωσης του DNA, μετά από τροποποίηση στο πρωτόκολλο της PCR των Bader και Shotts (1998), η αποτελεσματικότητα ωστόσο της μεθόδου αμφισβητείται (Avendano- Herrera et al., 2004b).

## 1.9 Θεραπεία - Πρόληψη

Η εμφάνιση της νόσου μπορεί να περιοριστεί εάν δοθεί προσοχή στην ιχθυοπυκνότητα ανά κλωβό ή ανά δεξαμενή. Μειωμένες ιχθυοπυκνότητες βοηθούν τόσο στην ύφεση της νόσου όσο και στην πρόληψη. Η ποσότητα της χορηγούμενης τροφής παίζει επίσης σημαντικό ρόλο καθώς το υπερβολικό τάϊσμα αυξάνει άμεσα ή έμμεσα το οργανικό φορτίο της δεξαμενής με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ενδεχόμενο μόλυνσης των ψαριών από μυξοβακτηρίαση (Pazos et al., 1999).

Στις περιπτώσεις όπου η μόλυνση περιορίζεται στην επιδερμίδα των ψαριών, ενδείκνυται παρατεταμένη εμβάπτιση σε υπερμαγγανικό κάλιο, θειικό χαλκό ή

τεταρτοταγές αμμώνιο (Noga 2000). Η επιλογή των ανωτέρω θεραπειών ωστόσο, εξαρτάται κάθε φορά από τις επιτρεπόμενες προς χρήση χημικές ουσίες.

Μελέτες σχετικά με την ευαισθησία του παθογόνου σε διάφορα αντιβιοτικά σκευάσματα υπέδειξαν πως όλα τα μικροβιακά στελέχη, ανεξαρτήτως γεωγραφικού εντοπισμού, χαρακτηρίζονται από παρόμοιο προφίλ ευαισθησίας στην Χλωραμφαινικόλη, τις τετρακυκλίνες, τις νιτροφουράνες και τις σουλφοναμίδες ενώ παρουσιάζουν αντίσταση στις κινολόνες, στο οξολινικό οξύ και την φλουμικίνη (Avendano- Herrera et al.,2008). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ταχεία και συνδυαζόμενη αντίσταση στις κινολόνες εξαιτίας της ευρείας χρήσης τους σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας (Toranzo et al., 1993). Η αντίσταση αυτή είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα γονίδια της γυράσης των βακτηρίων (Avendano- Herrera et al.,2008). Η αντίσταση των στελεχών του *Tenacibaculum maritimum* είναι πολύ πιθανό πως προκύπτει από παρόμοιους μηχανισμούς μιας και δεν έχουν παρατηρηθεί πλασμίδια ή έτερες ομοιομερείς δομές (Avendano- Herrera et al.,2006). Σε in vitro εργαστηριακές μελέτες, η χορήγηση νιτροφουράνων είτε από το στόμα είτε με εμβάπτιση στα πρώτα στάδια εκδήλωσης της νόσου μπορεί να είναι αποτελεσματική (Pazos et al., 1999), η χρήση ωστόσο αυτού του φαρμάκου δεν επιτρέπεται στις υδατοκαλλιέργειες στην πλειονότητα των χωρών. Η αυξανόμενη χρήση των αντιβιοτικών και η υψηλή συχνότητα των θεραπειών μπορούν να δημιουργήσουν ανθεκτικά στελέχη ως προς τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Στην Ισπανία, έχουν ήδη απομονωθεί στελέχη ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες και τις σουλφοναμίδες (Pazos et al., 1999).

Στην καλλιέργεια των σολομοειδών η μόλυνση από μυξοβακτηρίαση μπορεί να προκαλέσει την απώλεια έως και του 30% του ζωικού κεφαλαίου (Handlinger et al.,1997). Η θεραπεία αν και ενδεδειγμένη αποτελεί πραγματική πρόκληση. Η Τριμεθοπρίμη η οποία συνίσταται σε αυτές τις περιπτώσεις, έχει χρόνο αναμονής για τα σολομοειδή 500 βαθμοημέρες, όμως σε συνδυασμό με τις θερμοκρασιακές συνιστώσες εκτροφής, ο χρόνος αναμονής μπορεί να είναι μεγαλύτερος από τον χρόνο εκτροφής (Gelderen et al.,2009). Η Αμοξικιλίνη χρησιμοποιείται όταν τα ψάρια που έχουν μολυνθεί βρίσκονται κοντά στο εμπορικό μέγεθος μιας και έχει χρόνο αναμονής 50 βαθμοημέρες, ωστόσο δεν είναι εξίσου αποτελεσματική (Cameron et al.,1993; Handlinger et al.,1997). Η οξυτετρακυκλίνη αν και έχει καλά

αποτελέσματα έναντι της μυξοβακτηρίασης, είναι υπεύθυνη για διάφορες επιβλαβείς μακροχρόνιες συνέπειες (Soltani et al., 1996)

Μέχρι πρότινος, δεν υπήρχε κάποιο εμβόλιο για την πρόληψη της ασθένειας (Bernardet 1997). Απόπειρες για παραγωγή εμβολίου κατά του *T. Maritimum* στα σολομοειδή, έδωσαν μεικτά αποτελέσματα καθώς αν και προέκυψαν σχετικά υψηλές τιμές σε RPS (79-80%) η θνησιμότητα ήταν μεγάλη (Carson et al, 1993,1994; Gelderen et al., 2009). Στην Ιαπωνία παρόμοιες έρευνες για το φαγκρί (*Pagrus major*) και την ψευδόγλωσσα (*Paralichthys olivaceous*) υπέδειξαν αντιγονική ετερογένεια στελεχών μεταξύ των δύο ειδών καθώς τα αυτεμβόλια τους δεν προκάλεσαν διασταυρούμενη ανοσία, γεγονός που ενισχύει την πεποίθηση πολλαπλών ορότυπων (Kato et al., 2007). Στο Φαγκρί (*Pagrus major*) πειραματικό εμβόλιο με εμβάπτιση κατάφερε να δώσει ικανοποιητικές τιμές RPS (Kato et al., 2006). Στην Ιταλία έγιναν έρευνες για την δημιουργία ενός εμβολίου κατά της μυξοβακτηρίασης για το λαβράκι (*D. labrax*) κατασκευασμένο από πολυσακχαρίτες του στελέχους, με το οποίο επιτεύχθηκε αυξημένη ανοσοενίσχυση (Salati et al., 2005). Σήμερα, κυκλοφορεί μόνο ένα εμπορικό εμβολιακό σκεύασμα (FM-95) ως πατέντα του πανεπιστημίου Santiago de Compostela της Ισπανίας για την αποτελεσματική πρόληψη της μυξοβακτηρίασης στο καλκάνι (Santos et al., 1999). Η ασθένεια στο καλκάνι εντοπίζεται τόσο στα νεαρά όσο και στα ενήλικα άτομα για τον λόγο αυτό το συγκεκριμένο εμβόλιο γίνεται με εμβάπτιση ,στα 1-2 γρ και αργότερα ενέσιμα όταν τα ψάρια φτάσουν τα 20- 30 γρ. Το ποσοστό προστασίας μετά την εμβάπτιση ανέρχεται στο 50%. Όταν το εμβόλιο χορηγείται ενέσιμα το ποσοστό προστασίας είναι πάνω από 85% (Toranzo et al., 2005).

Φυσικά το προαναφερθέν εμβολιακό σκεύασμα δεν είναι ικανό να προστατέψει άλλα είδη ψαριών πλην του καλκανιού από την μυξοβακτηρίαση και αυτό γιατί όπως προαναφέρθηκε οι τρεις διαφορετικοί ορότυποι έχουν εξειδίκευση ξενιστών. Στην παρούσα φάση μελετάται ένα νέο πειραματικό εμβόλιο το οποίο εργαστηριακά μέχρι στιγμής φαίνεται να παρέχει προστασία στους εξειδικευμένους ξενιστές του ορότυπου 2 πάνω από 95% (Romalde et al., 2005).

Οι τρεις ορότυποι έχουν μεικτή λοιμογόνο δύναμη ενώ οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν τους μηχανισμούς παθογένειας της νόσου δεν έχουν διασαφηνιστεί. Ορισμένες συνεργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τοξίνων των εξωκυτταρικών υγρών και της αιμολυσίνης ίσως να εμπλέκονται σε αυτούς τους

μηχανισμούς (Baxa et al.,1988), ωστόσο τελευταίες μελέτες εστιάζουν στην ικανότητα των μυξοβακτηριδίων να απορροφούν σίδηρο, γεγονός που ενδέχεται να καθορίζει σε ένα βαθμό την παθογένεια του βακτηρίου (Avendano- Herrera et al.,2005). Το είδος *Tenacibaculum maritimum* διατηρεί τουλάχιστον δύο μηχανισμούς απορρόφησης σιδήρου από τους ξενιστές του. Ο πρώτος μηχανισμός συνδέεται με την σύνθεση σιδηροφόρων και ο δεύτερος με την εκμετάλλευση του μορίου της αίμης ως κύρια πηγή σιδήρου (Avendano- Herrera et al.,2005).



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι αρχικά η διερεύνηση του βιοχημικού προφίλ των μυξοβακτηρίων *Tenacibaculum maritimum* εντός των ελληνικών συνόρων. Ο έλεγχος αφορά κατά κύριο λόγο ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας με κλινική εκδήλωση νόσου παρόμοιας με εκείνης της μυξοβακτηρίασης, και τα αποτελέσματα που θα προκύψουν θα δώσουν μια σαφή εικόνα για το εάν τελικά αυτά τα βακτήρια χαρακτηρίζονται από ένα ομοιογενές βιοχημικό προφίλ τόσο στο σύνολο τους όσο και μεταξύ των ειδών που προσέβαλαν (ειδοειδική ομοιογένεια).

Στις περισσότερες βιβλιογραφικές παραπομπές το βιοχημικό προφίλ των μυξοβακτηρίων δεν είναι ικανό να αποτελέσει μέσο διαφορικής διάγνωσης σε επίπεδο είδους. Στην παρούσα μελέτη έχουν αυξηθεί οι ως προς μελέτη βιοχημικές συνιστώσες χρησιμοποιώντας 4 εμπορικά συστήματα βιοχημικών αναλύσεων (API 20E, API 20NE, API 50CH και API ZYM με σκοπό να αυξηθεί η δυναμική της μεθόδου.

Εξετάζοντας συνολικά 95 βιοχημικές συνιστώσες, γίνεται προσπάθεια αφενός για διαφορική διάγνωση σε επίπεδο είδους, και αφετέρου για να προκύψει ένας πίνακας βιοχημικής αναφοράς για αυτό το βακτήριο.

Στην δεύτερη φάση όλα τα στελέχη θα ταυτοποιηθούν μέσω μοριακών διαγνωστικών τεχνικών (PCR), έτσι ώστε να επαληθευθεί ότι τα κλινικά περιστατικά ήταν μολυσμένα με στέλεχος του *Tenacibaculum maritimum*. Μετά και το πέρας των μοριακών εξετάσεων θα προκύψει μια τελική σύγκριση των δύο τεχνικών παραθέτοντας τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα κάθε μεθόδου.

## 2.2 Συλλογή Δειγμάτων

Η συλλογή των βακτηρίων έγινε με την ευγενή συνεργασία αρκετών μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας εντός των ελληνικών συνόρων. Συγκεντρώθηκαν συνολικά **15** στελέχη βακτηρίων. Τα στελέχη είτε προέρχονταν από ψάρια τα οποία παρουσίαζαν κλινικά συμπτώματα αντίστοιχα με αυτά της μυξοβακτηρίασης, είτε από αυγά ιχθυογεννητικών σταθμών τα οποία απέκλιναν μορφολογικά του φυσιολογικού τόσο στο χρώμα όσο και στο σχήμα, και τα οποία ήτο ύποπτα βακτηριακής μόλυνσης.

Έγινε προσπάθεια να συμπεριληφθούν περιστατικά που να καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της ελληνικής θαλάσσιας περιφέρειας ούτως ώστε να διερευνηθεί αν και κατά πόσο τα κλινικά περιστατικά αντιστοιχούν σε μόλυνση που προκύπτει από το *Tenacibaculum maritimum*. Για τον λόγο αυτό, τα βακτηριακά στελέχη διαχωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες εξαρτώμενα από την περιοχή όπου εντοπίστηκαν. Αυτές οι τέσσερις ομάδες αντιστοιχούν και σε ένα γεωγραφικό τεταρτημόριο του ελλαδικού χώρου (εικόνα 2). Συνολικά από τα **15** περιστατικά, **4** συλλέχθηκαν από το Βόρειο Αιγαίο, **4** από το Νότιο Αιγαίο, **3** από το Νότιο Ιόνιο και **4** από το Βόρειο Ιόνιο.



Εικόνα2. Σημεία δειγματοληψίας βακτηρίων ανά γεωγραφικό τεταρτημόριο

Για την απλοποίηση του χειρισμού των δειγμάτων, δόθηκε σε κάθε δείγμα ξεχωριστός κωδικός αναγνώρισης. Κάθε κωδικός συγκροτείται από τρία σκέλη. Το πρώτο σκέλος αφορούσε το γεωγραφικό τεταρτημόριο προέλευσης. Για τα τέσσερα τεταρτημόρια χρησιμοποιήθηκαν αριθμοί, ένας για κάθε τεταρτημόριο όπως προκύπτει παρακάτω: (1. Βόρειο Ιόνιο, 2. Νότιο Ιόνιο, 3. Βόρειο Αιγαίο, 4. Νότιο Αιγαίο), αντίστοιχα. Το δεύτερο σκέλος συμπληρώθηκε είτε με αριθμό (π.χ 1.2.3 κ.ο.κ) είτε με συνδυασμούς λατινικών γραμμάτων και αριθμών μαζί., τα οποία αφορούσαν περιοχή ενώ το τρίτο σκέλος αφορούσε το είδος ψαριού από το οποίο απομονώθηκε το βακτηριακό στέλεχος (TS=τσιπούρα, LV=λαυράκι και EGG=αυγά). Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) παρουσιάζονται οι κωδικοί των 15 δειγμάτων.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΕΩΓΡ. ΤΕΤΑΡΤΗΜΟΡΙΟ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ
1.	1 (ΒΟΡΕΙΟ ΙΟΝΙΟ)	SGK23	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	1.SGK23.LV
2.	1 (ΒΟΡΕΙΟ ΙΟΝΙΟ)	SGK4	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	1.SGK4.LV
3.	1 (ΒΟΡΕΙΟ ΙΟΝΙΟ)	1PROPA9.TS	ΤΣΙΠΟΥΡΑ (TS)	1.SGK3.TS
4.	1 (ΒΟΡΕΙΟ ΙΟΝΙΟ)	PROPB4	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	1.PROPB4.LV
5.	2 (ΝΟΤΙΟ ΙΟΝΙΟ)	XL	ΑΥΓΑ ΛΑΥΡΑΚΙ (EGG)	2.XL.EGG
6.	2 (ΝΟΤΙΟ ΙΟΝΙΟ)	XL1	ΛΑΥΡΑΚΙ(LV)	2.XL1.LV
7.	2 (ΝΟΤΙΟ ΙΟΝΙΟ)	XL2	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	2.XL2.LV
8.	4 (ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	SFK1	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	4.SFK1.LV
9.	4 (ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	SFK2	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	4.SFK2.LV
10.	4 (ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	SFK3	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	4.SFK3.LV
11.	4 (ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	SFK4	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	4.SFK4.LV
12.	3 (ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	KAN1	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	3.KAN1.LV
13.	3 (ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	KAN2	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	3.KAN2.LV
14.	3 (ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	KAN3	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	3.KAN3.LV
15.	3 (ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ)	KAN4	ΛΑΥΡΑΚΙ (LV)	3.KAN4.LV

**Πίνακας 2.** Κωδικοί των βακτηριακών στελεχών ανά γεωγραφικό τεταρτημόριο, περιοχή και είδος ξενιστή.

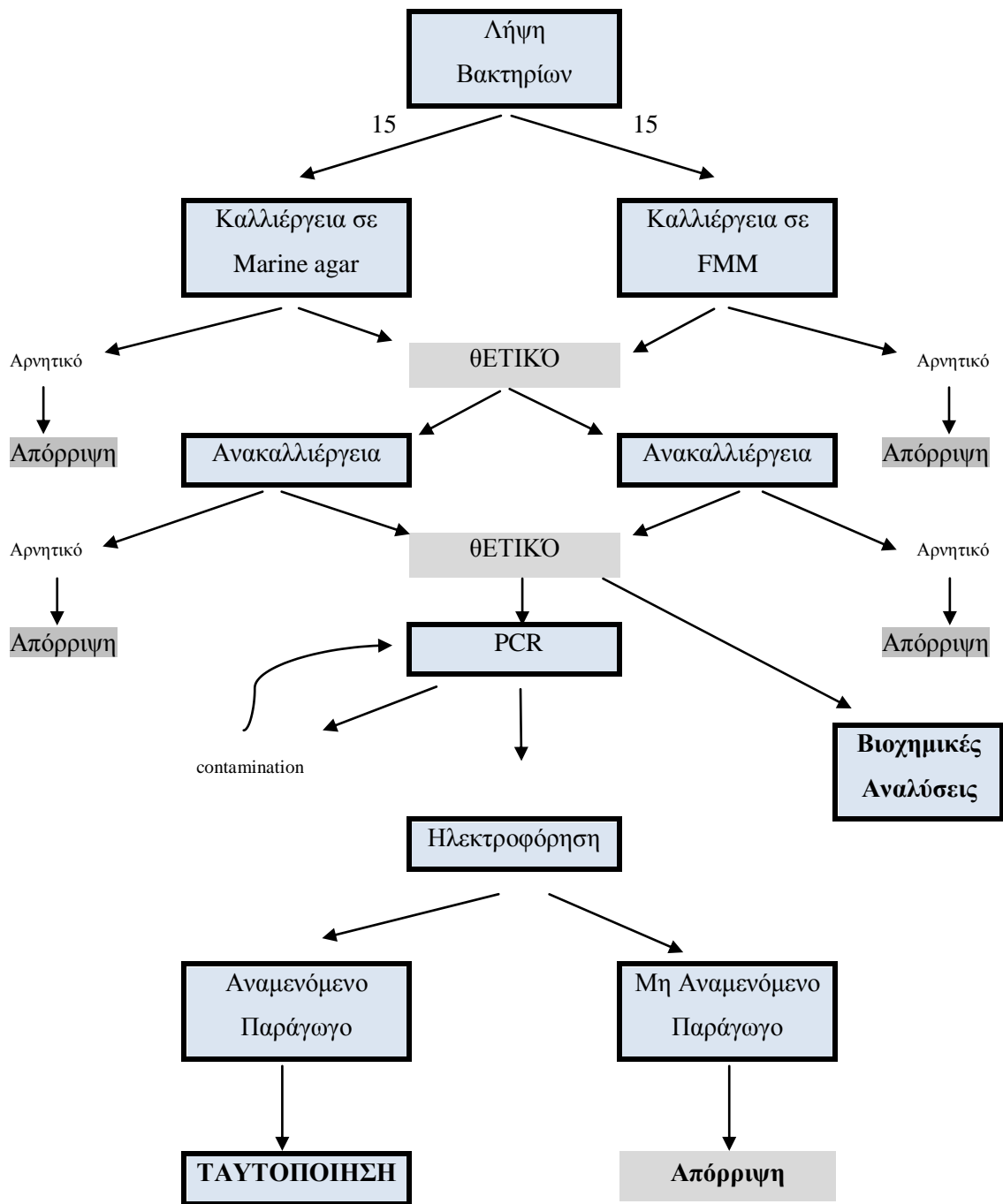
### 2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα στάλθηκαν στο εργαστήριο εντός το πολύ 6 ωρών από την στιγμή όπου συλλέχθηκαν. Μεταφέρθηκαν είτε ως ολόκληρα ψάρια, είτε ως ενοφθαλμισμένα μάκτρα (swabs) από το σημείο της μόλυνσης του σώματος των ψαριών. Στην περίπτωση των swabs, έγινε απευθείας ενοφθαλμισμός στα θρεπτικά υποστρώματα (MA & FMM), χωρίς να απαιτείται κάποια περαιτέρω προετοιμασία. Στην περίπτωση όπου τα δείγματα αφορούσαν ολόκληρα ψάρια λήφθηκε υγρό τοπικά της μόλυνσης με κρίκο και έγινε η σπορά στα υποστρώματα.

### 2.2.2 Κριτήρια αποδοχής/ απόρριψης των δειγμάτων

Τα διάφορα απομονωθέντα βακτήρια έπρεπε να τηρούν κάθε κριτήριο αποδοχής αλλά ταυτόχρονα να μην ικανοποιούν κανένα κριτήριο απόρριψης. Αυτό με λίγα λόγια σημαίνει:

- Πως θα πρέπει να προέρχονται από την Ελλάδα.
- Πως θα πρέπει να είναι βιώσιμα μέσα σε καλλιέργεια FMM (*Flexibacter maritimum* media) ή Marine Agar.
- Πως θα πρέπει να είναι βιώσιμα και σε ανακαλλιέργεια στα ανωτέρω υποστρώματα.
- Πως θα πρέπει να αντιδρούν θετικά στο PCR πρωτόκολλο ανίχνευσης για *Tenacibaculum maritimum*.
- Πως η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της θεμιτής περιοχής του γενετικού υλικού των βακτηρίων, θα πρέπει να αντιστοιχεί στο αναμενόμενο θραύσμα.



Σχεδιάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής του συνόλου των εργαστηριακών αναλύσεων

## 2.3 Καλλιέργεια – Ανακαλλιέργεια στελεχών

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα FMM και MARINE agar, τα οποία χαρακτηρίζονται ως τα καταλληλότερα για την ανάπτυξη του *Tenacibaculum maritimum* (Avendano- Herrera et al., 2005; Pazos et al., 1996). Οι σπορές επώαστηκαν στους 18°C έως ότου αναπτυχθούν αποικίες. Βιβλιογραφικά αναφέρεται πως οι αποικίες εμφανίζονται 1-3 ημέρες μετά την σπορά. Για αυτό τον λόγο ο μέγιστος χρόνος αναμονής για την εμφάνιση αποικιών μετά την σπορά ορίστηκε στις 7 ημέρες, χρόνος σχεδόν διπλάσιος της μέγιστης επώασης, για την εμφάνιση του φαινομένου. Όσα βακτήρια δεν εμφάνισαν αποικισμό και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα, απορρίφθηκαν από την μελέτη ενώ τα υπόλοιπα όπου εμφάνισαν αποικισμό σε ένα από τα δύο υποστρώματα, ανακαλλιεργήθηκαν.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο στάδιο της καλλιέργειας των βακτηρίων από την συλλογή των δειγμάτων έως και την ανακαλλιέργεια:

ΗΜΕΡΑ	ΕΡΓΑΣΙΑ
1 <sup>η</sup>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία</li> <li>2. Ενοφθαλμισμός στα θρεπτικά υποστρώματα MA και FMM</li> <li>3. Επώαση στους 25°C</li> </ol>
2 <sup>η</sup> (24h)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Εξέταση των υποστρωμάτων</li> <li>2. Επιλογή των ύποπτων αποικιών και ενοφθαλμισμός σε δευτερεύοντα θρεπτικά υποστρώματα MA και FMM</li> <li>3. Επαναεπώαση των μητρικών καλλιιεργειών</li> <li>4. Επώαση των θυγατρικών καλλιιεργειών</li> </ol>
3 <sup>η</sup> (48h)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Επανεξέταση των μητρικών υποστρωμάτων για τυχόν βραδείας ανάπτυξης βακτήρια</li> <li>2. Εξέταση των θυγατρικών καλλιιεργειών για μονοειδοειδικό αποικισμό</li> <li>3. Προετοιμασία και επώαση των βιοχημικών kit</li> <li>4. Ενοφθαλμισμός στα βιοχημικά αντιδραστήρια</li> <li>5. Επαναεπώαση των μητρικών καλλιιεργειών</li> </ol>
4 <sup>η</sup> (72h)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Επανεξέταση των μητρικών υποστρωμάτων για τυχόν βραδείας ανάπτυξης βακτήρια</li> <li>2. Έλεγχος αποτελεσμάτων των βιοχημικών αναλύσεων και καταγραφή αποτελεσμάτων 24ώρου</li> </ol>
5 <sup>η</sup> (96h)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Έλεγχος αποτελεσμάτων των βιοχημικών αναλύσεων και καταγραφή αποτελεσμάτων 48ώρου</li> <li>2. Προσθήκη αντιδραστηρίων για εξέταση Ινδόλης και νιτρικών</li> <li>3. Διερμηνεία αποτελεσμάτων βιοχημικών αναλύσεων</li> </ol>

**Πίνακας 3.** Βήματα και μεθοδολογία πρωτοκόλλου καλλιέργειας μυξοβακτηρίων

## 2.4 Βιοχημικές αναλύσεις

Για τη ταυτοποίηση του βιοχημικού προφίλ των βακτηρίων επιλέχθηκαν καθαρές αποικίες από θυγατρικές καλλιέργειες. Προτιμήθηκαν αποικίες από το τρίτο και τέταρτο τεταρτημόριο των τριβλίων της ανακαλλιέργειας και όχι από το πρώτο ή δεύτερο τεταρτημόριο απ' όπου ξεκίνησε αρχικά η σπορά. Με αυτόν τον τρόπο, για κάθε περίπτωση λαμβάνεται δείγμα πιο εύκολα μιας και η επιλογή της αποικίας δεν γίνεται εντός του συνονθυλεύματος αποικιών του πρώτου και δευτέρου τεταρτημορίου και αφετέρου ελέγχεται το μέγεθος της αποικίας. Πριν από την έναρξη κάθε βιοχημικού ελέγχου, έγινε μικροσκοπικός και μακροσκοπικός έλεγχος των αποικιών για εξεταστούν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών (χρώμα, υφή, μέγεθος και κινητικότητα των βακτηρίων, χρώση Gram), όπως αυτά προκύπτουν από το κεφάλαιο 1.8.1.

Για τον έλεγχο του βιοχημικού προφίλ των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά αντιδραστήρια API 20E, API 20NE, API 50CH και API ZYM της Biomeriuex. Πρόκειται για τυποποιημένα συστήματα γρήγορης ταυτοποίησης, για αρνητικά κατά χρώση Gram βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν έναν αριθμό μικρής κλίμακας βιοχημικών τεστ τα αποτελέσματα των οποίων συγκρίνονται με μια βάση δεδομένων. Στην περίπτωση του *Tenacibaculum maritimum* η βάση δεδομένων τόσο για το API 20E όσο και για τα υπόλοιπα δεν περιέχει το βακτήριο στις καταχωρήσεις, έτσι τα αποτελέσματα που θα προκύψουν, θα συγκριθούν τόσο μεταξύ τους όσο και βιβλιογραφικά για να επαληθευτεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

Κάθε τέτοιο σύστημα ταυτοποίησης εξετάζει ξεχωριστά ένα σύνολο βιοχημικών συνιστωσών. Ωστόσο, κάποια από αυτά τα μεμονωμένα βιοχημικά τεστ συναντώνται σε δύο ή και παραπάνω συστήματα ταυτοποίησης (π.χ. GLU και MAN συναντώνται τόσο στο API 20E όσο και στα API 20NE και API ZYM). Συνολικά λοιπόν θα γίνει έλεγχος για 93 βιοχημικές αντιδράσεις (οι αλλιώς 108 αντιδράσεις εκ των οποίων οι 15 επαναλαμβάνονται). Εκτός από τις 93 βιοχημικές αντιδράσεις έγινε περαιτέρω έλεγχος για OX (οξυδάση) και για μείωση Νιτρικών (Νιτρικό Κάλιο).



## 2.4.1 API 20 E

Για τις βιοχημικές εξετάσεις τόσο για το API 20E όσο και για τα υπόλοιπα χρησιμοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες μικρού χρόνου επώασης (18-24h). Γίνεται λήψη μιας και μόνο καλά ανεπτυγμένης αποικίας του βακτηρίου και ενοφθαλμίζεται σε σωλήνα 5ml διαλύματος NaCl 0.85%. Ακολουθεί συνεχής ανάδευση έως ότου την πλήρη ομογενοποίηση του ενοφθαλμίσματος. Το προκύπτον διάλυμα πρέπει σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή να χρησιμοποιηθεί άμεσα για τον λόγο αυτό θα πρέπει να έχει προηγηθεί η προετοιμασία του δίσκου και των αντιδραστηρίων για να μειωθεί κατά το δυνατόν περισσότερο ο χρόνος αναμονής του ενοφθαλμίσματος. Στον δίσκο επώασης προσθέτουμε αποσταγμένο νερό για να δημιουργηθεί υγρή ατμόσφαιρα στις ειδικές θήκες του δίσκου. Αναγράφουμε με αδιάβροχο μαρκαδόρο τον κωδικό του βακτηρίου και τοποθετούμε μέσα στον δίσκο την πλακέτα με τα αντιδραστήρια. Με μια γυάλινη μικροπιπέτα γεμίζουμε τον κορμό και τον θόλο των CIT, VP και GEL, ενώ στα υπόλοιπα αντιδραστήρια γεμίζουμε με το βακτηριακό διάλυμα μόνο μέχρι τον κορμό του σωληνίσκου και όχι μέχρι τον θόλο. Στα αντιδραστήρια ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S και URE πληρούμε τους σωληνίσκους μέχρι τον κορμό και καλύπτουμε με παραφίνη για να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες. Κλείνουμε τον δίσκο με το καπάκι και επωάζουμε στους 36<sup>0</sup>C για 24h. (API Analytab products manual).

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης καταγράφουμε όλα τα αποτελέσματα εκτός των τεστ TDA, IND και VP, στα οποία προσθέτουμε τα ανάλογα αντιδραστήρια σύμφωνα με τον κατασκευαστή για να προκύψει ο χρωματισμός που θα καθορίσει και το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Τα αντιδραστήρια για το τεστ Ινδόλης (IND) προστίθενται τελευταία καθώς παράγονται αέρια τα οποία μπορούν να αλλοιώσουν τα άλλα αποτελέσματα. Εάν ο αριθμός των θετικών (+) αντιδράσεων είναι μικρότερος του 3 (συμπεριλαμβανομένου και της Γλυκόζης (GLU)), τότε επαναεπωάζουμε για άλλες 24h. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ένας επταψήφιος αριθμός χαρακτηριστικός για το υπό μελέτη βακτήριο. Τα τεστ διαχωρίζονται σε ομάδες των 3 και δηλώνεται η τιμή 1, 2 ή 4 για κάθε τριάδα. Προσθέτοντας μαζί τις τιμές που ανταποκρίνονται στις θετικές αντιδράσεις για κάθε τριπλέτα, προκύπτει και

ο επταημέριος αριθμός από τα 21 συνολικά τεστ. Το τεστ οξυδάσης (OX) αποτελεί το 21ο τεστ και έχει την τιμή 4 εάν είναι θετικό.

## 2.4.2 API 20NE

Η διαφοροποίηση αυτού του βιοχημικού συστήματος σε σύγκριση με το API 20E έγκειται στο ότι είναι αναγκαία η χρήση ενοφθαλμίσματος βακτηριακής συγκέντρωσης  $1.5 \cdot 10^8$  CFU/ml (0.5 McFarland)(εμπειρικά απαιτούνται 3 βακτηριακές αποικίες για κάθε 2ml διαλύματος). Το API 20NE αποτελείται από 8 συμβατικά τεστ και 12 τεστ αφομοίωσης, έτσι κατά τα πρώτα 8 τεστ προκύπτει χρωματισμός ενώ κατά τα υπόλοιπα 12 χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα βακτηριακού φορτίου το οποίο θα πολλαπλασιαστεί (ή όχι) αξιοποιώντας το αντίστοιχο υπόστρωμα του σωληνίσκου. Οι αποικίες ενοφθαλμίζονται σε σωλήνα 2ml διαλύματος NaCl 0.85% και ακολουθεί ανάδευση έως την πλήρη ομογενοποίηση. Από το τεστ νιτρικών ( $\text{NO}_3$ ) έως και το τεστ Νιτροφαινιλογαλακτοπυρανοσίδης (PNPG) γίνεται ενοφθαλμισμός των σωληνίσκων έως τον κορμό (όχι τον θόλο), χρησιμοποιώντας την ίδια πιπέτα. Για να μην προκύψουν φυσαλίδες στην βάση του κορμού του σωλήνα, ενοφθαλμίζουμε υπό κλίση. Στην συνέχεια διαλύουμε 200μl βακτηριακού διαλύματος σε μια αμπούλα που περιέχει API AUX MEDIUM όπως υποδεικνύεται από τον κατασκευαστή. Στην συνέχεια γεμίζουμε τους υπόλοιπους σωληνίσκους (GLU έως PAC) με το προκύπτων βακτηριακό διάλυμα πλήρως (κορμός και θόλος), αφήνοντας ωστόσο έναν μηνίσκο αέρα στον τρούλο του θόλου. Στα τεστ Γλυκόζης, Αργινίνης και ουρίας (GLU, ADH, URE) δημιουργούμε αναερόβιες συνθήκες προσθέτοντας στο άνοιγμα του θόλου παραφίνη. Κλείνουμε τον δίσκο με το καπάκι και επωάζουμε στους  $29^\circ\text{C}$  για 24h.

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης καταγράφουμε τα αποτελέσματα των GLU, ADH, URE, ESC, GEL και PNPG. εκτός των τεστ  $\text{NO}_3$  και TRP, στα οποία προσθέτουμε τα ανάλογα αντιδραστήρια σύμφωνα με τον κατασκευαστή για να προκύψει ο χρωματισμός που θα καθορίσει και το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Τα τεστ αφομοίωσης δίνουν θετικό αποτέλεσμα ανάλογα με την θολερότητα και όχι με κάποιον έντονο χρωματισμό όπως στα υπόλοιπα τεστ.

Μετά από 24h αφαιρούμε τα αντιδραστήρια από τα τεστ NO<sub>3</sub> και TRP και αντικαθιστούμε με παραφίνη, έπειτα επαναεπωάζουμε για 24h στους 29<sup>0</sup>C. Μετά και το πέρας των 24h καταγράφουμε τα αποτελέσματα πλην των NO<sub>3</sub>, TRP και GLU τα αποτελέσματα των οποίων καταγράφονται στο πρώτο 24ωρο. Η βαθμονόμηση προκύπτει σύμφωνα με τα δεδομένα που αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.4.1.

### 2.4.3 API 50CH

Το βιοχημικό σύστημα API 50CH αποτελείται από 49 βιοχημικά τεστ από τα οποία προκύπτει η τάση των υπό μελέτη βακτηρίων για ζυμωτικές δραστηριότητες των υδρογονανθράκων. Με αυτόν τον τρόπο αυτό είναι ικανή ή παρατήρηση όχι μόνο της οξείδωσης που προκύπτει στους υδρογονάνθρακες αλλά και η αφομοίωση των υδρογονανθράκων από τα βακτήρια ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με εκείνη για τα API 20E και API 20NE, ωστόσο υπάρχουν κάποιες σημαντικές διαφορές. Αρχικά γίνεται προετοιμασία του δίσκου με προσθήκη 10ml αποσταγμένου νερού στην βάση του. Γίνεται καταγραφή του κωδικού του υπό εξέταση βακτηρίου με αδιάβροχο μαρκαδόρο και στην συνέχεια γίνεται διαχωρισμός της πλάκας με τα 49 αντιδραστήρια (+ μάρτυρας) σε πέντε πλάκες των 10 αντιδραστηρίων. Όλα μαζί τοποθετούνται στον δίσκο όπου και γίνεται ο ενοφθαλμισμός των θαλαμίσκων.

Η μεθοδολογία για την παρασκευή του βακτηριακού διαλύματος διαφοροποιείται των προηγούμενων μεθόδων. Από το θρεπτικό μέσο της ανακαλλιέργειας συγκομίζουμε όλες τις αποικίες από το τριβλίο με μάκτρο (swab) και τις μεταφέρουμε σε 10 ml διαλύματος API CHB/E Medium. Το τελικό βακτηριακό διάλυμα που πρέπει να προκύψει σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή πρέπει να έχει συγκέντρωση  $6 \cdot 10^8$  XFU/ml (θολερότητα 2 Macfarland) οπότε εάν χρειαστεί επεμβαίνουμε με διαδοχικές αραιώσεις.

Κατά τον ενοφθαλμισμό των 49 αντιδραστηρίων είναι σημαντικό να διατηρηθούν αναερόβιες συνθήκες. Οι σωληνίσκοι πρέπει να γεμίσουν πλήρως με βακτηριακό διάλυμα (κορμός και θόλος) ενώ κατά το τελευταίο στάδιο πρέπει να

δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο να μην δημιουργηθεί μηνίσκος στον τρούλο του θόλου του σωληνίσκου. Η επώαση γίνεται στους 30<sup>0</sup>C, για 48 ώρες.

#### **2.4.4 API ZYM**

Το βιοχημικό σύστημα API ZYM έχει ξεκινήσει και αυτό να αποτελεί σημαντικό βιοχημικό εργαλείο για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών ωστόσο δεν αποτελεί κοινή πρακτική. Είναι χρήσιμο για βακτήρια του γένους *Pasteurella* και ως διαγνωστικό εργαλείο είναι ικανό να διαφοροποιήσει ακόμα και είδη του ίδιου γένους βακτηρίων όταν ο φαινοτυπικός έλεγχος είναι αμφίβολος.

Αποτελείται από 19 βιοχημικά τεστ (+ μάρτυρας) τα οποία παρουσιάζουν το ενζυματικό προφίλ του προς υπό εξέταση βακτηρίου. Η μέθοδος δεν βασίζεται τόσο στον χρωματισμό των αντιδραστηρίων όσο στην ένταση του χρώματος του αντιδραστηρίου. Για αυτό τον λόγο είναι πολύ σημαντική τόσο η ομογενοποίηση του αρχικού βακτηριακού διαλύματος όσο και η συγκέντρωση του. Συνίσταται συγκέντρωση 48\* 10<sup>8</sup> CFU/ml (MacFarland 6).

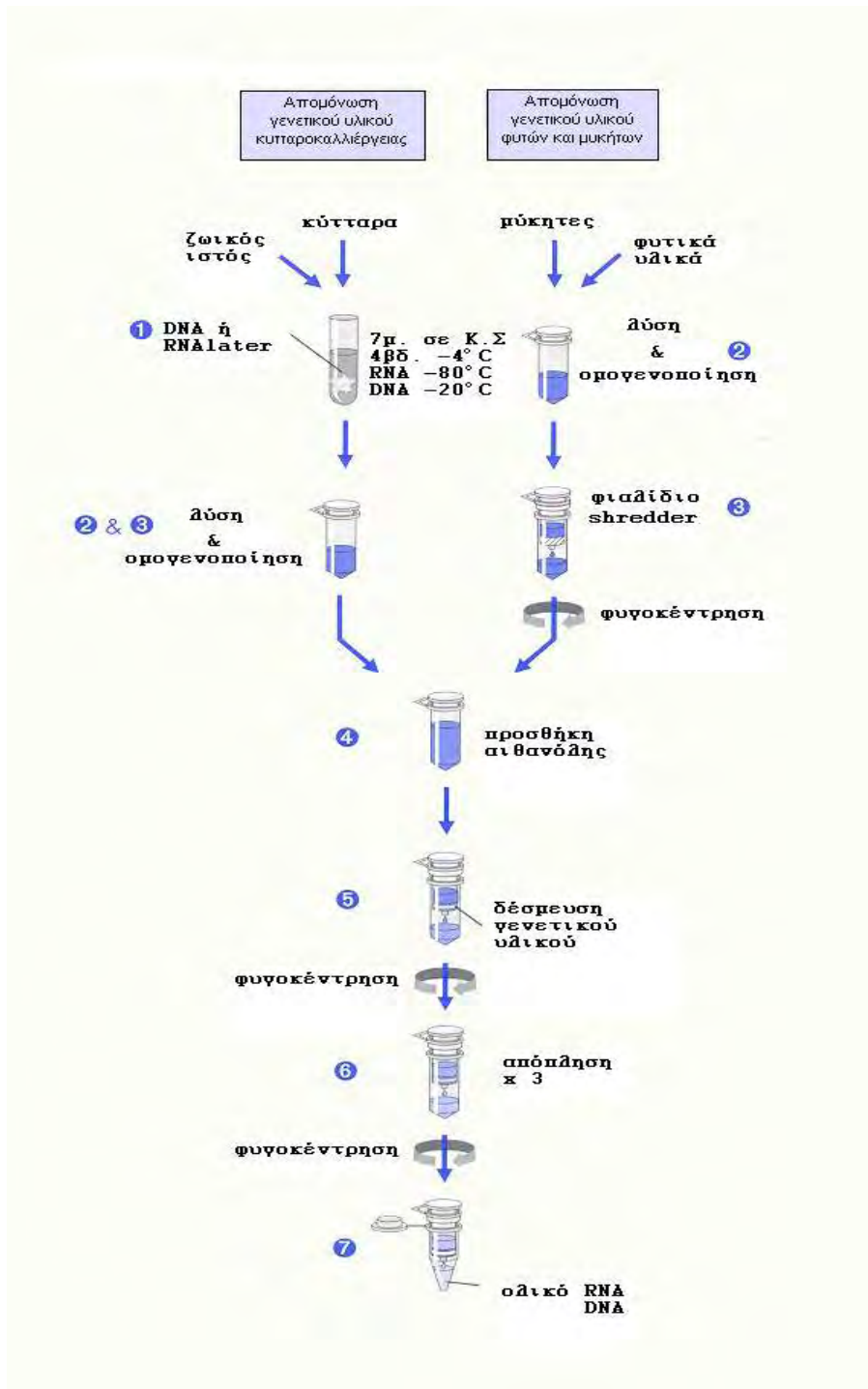
Η προετοιμασία του δίσκου και των αντιδραστηρίων είναι παρόμοια με τα βιοχημικά συστήματα API 20 E και API 20NE. Πρόκειται για ένα τεστ με γρήγορα αποτελέσματα καθώς ο χρόνος επώασης στους 25<sup>0</sup>C είναι 24h.

### **2.5 Απομόνωση Γενετικού υλικού**

Όσα βακτήρια μετά την επανασπορά εμφάνισαν αποικισμό, συγκομίστηκαν μετά από 24 ώρες σύμφωνα με Toyama (1996), και διαλύθηκαν πλήρως σε διάλυμα ATL με πλήρη ομογενοποίηση. Σε περίπτωση όπου αντί για καλλιέργεια έχουμε ιστό ψαριού, η διαδικασία είναι παρόμοια. Λαμβάνεται μικρό μέρος ιστού από την μολυσμένη περιοχή και τοποθετείται σε φιαλίδιο Eppendorf όπου και ομογενοποιείται πλήρως. Στην συνέχεια προστίθενται 20μl πρωτεϊνάσης K. Απαιτούνται περί τις 2 περίπου ώρες για να δράσει η πρωτεϊνάση K. Στην συνέχεια

το διάλυμα χρησιμοποιείται για απομόνωση του DNA χρησιμοποιώντας το εμπορικό DNeasy Tissue Kit της Qiagen. Το απομονωμένο πλέον DNA του κάθε βακτηρίου επαναδιαλύθηκε σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα όγκου 200μl, μέσα σε κρυοφιαλίδιο το οποίο και φυλάχθηκε στους -20°C. Σε όλη την διαδικασία χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας (απεσταγμένο νερό). Εάν παρατηρηθεί επιμόλυνση στο αρνητικό μάρτυρα η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Η μεθοδολογία, ακολουθήθηκε βάση του πρωτοκόλλου που εμπεριέχονταν στο εγχειρίδιο χρήσης του εμπορικού kit σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.



Σχεδιάγραμμα 2: Μεθοδολογία απομόνωσης γενετικού υλικού (Qiagen Handbook)

## 2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση βακτηρίων *Tenacibaculum maritimum*

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε η ποσοτική ενίσχυση αυτού δημιουργώντας κόπιες και μετατρέποντας το από αμελητέα μάζα σε επεξεργάσιμη ποσότητα μέσα από την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Μια περαιτέρω επεξήγηση των αρχών λειτουργίας αυτής της τεχνικής θα ήταν μάλλον ανούσια στην παρούσα φάση, αυτό όμως που είναι σημαντικό να ειπωθεί είναι πως ενώ οι αρχές της τεχνικής είναι δεδομένες, δεν ακολουθείται ποτέ μια *a-priori* μεθοδολογία ενίσχυσης του γενετικού υλικού. (Bartlett & Stirling et al.,2003).

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνοι οι οποίοι προτείνονται από τους Toyama et al., 1996 και όχι από τους Bader- Shotts et al.,1998 καθώς προκύπτουν καθαρά αμπλικόνια με λίγα τεχνάσματα (artifacts)(Avendano-Herrera et al.,2004c). Στην περίπτωση της PCR για το *Tenacibaculum maritimum* χρησιμοποιήθηκαν δύο δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Avendano – Herrera et al., 2004c, και Toyama et al.,1996) στο οποίο έγιναν οι παρακάτω μετατροπές: Εν συντομία, χρησιμοποιήθηκαν 1,2μl Dmsο, Taq πολυμεράση 0,3μl, 1μl εκκινητών, dNTP 0,5μl, buffer 10x 2,5μl, MgCl<sub>2</sub> 1μl και 1μl από το απομονωμένο DNA. Στο μείγμα συμπληρώθηκε αποσταγμένο νερό (16μl) για τελικό όγκο μείγματος 25μl.

Σε ότι αφορά την διαδικασία αυτή καθαυτή, προβλέπεται αρχικά συνεχής θέρμανση στους 94°C για 2 λεπτά, με σκοπό να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου και να ξεκινήσει η διαδικασία της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA. Στην συνέχεια η PCR αποτελείται από 40 κύκλους **α)**120 δευτέρων στους 94°C για την αποδιάταξη, **β)** 90 δευτέρων στους 45°C για την υβριδοποίηση και **γ)** 120 δευτέρων στους 72°C για την προέκταση και πλήρη σύνθεση του επιλεγμένου τμήματος DNA. Για τους διάφορους θερμικούς κύκλους της PCR χρησιμοποιήθηκε ο εγκεκριμένων προδιαγραφών θερμοκυκλοποιητής Centurion, Scientific Ltd.

Η επιλογή των εκκινητών έγινε βάση δημοσιευμένου πρωτοκόλλου (Toyama et al., 1996) το οποίο προέβλεπε χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων **MAR<sub>1</sub>** (5'-AATGGCATCGTTTAAA-3') και **MAR<sub>2</sub>** (5'-CGCTCTCTGTTGCCAGA-3') με μοριακά βάρη 2239 και 2167 αντίστοιχα. Οι δύο αυτοί εκκινητές ενισχύουν ένα τμήμα DNA (κλάσμα) 1088 νουκλεοτιδίων.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως κατά τον οποιοδήποτε χειρισμό του γενετικού υλικού πριν και μετά την έναρξη της PCR, πρέπει να λαμβάνονται ειδικά μέτρα προφύλαξης αφενός μεν της ακεραιότητας των δειγμάτων και αφετέρου του χειριστή. Έτσι, όλα τα δείγματα πρέπει να χειρίζονται ως δυνητικά μολυσματικό υλικό, και ο εργαστηριακός χειριστής απαραιτήτως να φοράει γάντια νιτριλίου και εξοπλισμό προστασίας, ακολουθούμενος τις ασφαλείς εργαστηριακές διαδικασίες. Παράλληλα, πρέπει να αποφευχθεί η παραμικρή μίανση των δειγμάτων. Όλα τα υλικά απαιτείται να είναι αποστειρωμένα και ο πάγκος εργασίας απόλυτα καθαρός. Συνίσταται η χρήση στείρων αναλώσιμων πιπετών και ρυγχών πιπέτας (tips) με φίλτρο. Εάν αυτό είναι αδύνατο, τότε οι πιπέτες που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να καθαριστούν προ της χρήσης, με κάποια αλκοόλη. Κάθε επιφάνεια εργασίας πρέπει να καθαριστεί και να απολυμανθεί σχολαστικά είτε με διάλυμα χλωρίνης (NaClO 0.1%) είτε με IMS. Όλα αυτά τα μέτρα λαμβάνονται για να μειωθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης από κάποιο εξωγενές γενετικό υλικό, που θα μπορούσε κατά την PCR να αυξηθεί ποσοτικά και να προκαλέσει τεχνήματα, π.χ μη ειδική ενίσχυση. Μετά την PCR ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων ποσοτικά δειγμάτων.

### **2.6.1 Ηλεκτροφόρηση των DNA αμπλικονίων (PCR)**

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για την ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης είναι σχετικά απλός και περιλαμβάνει:

- Τον θάλαμο φόρτωσης και ηλεκτρικό τροφοδότη
- Μήτρα, χτένι
- Σκόνη αγαρόζης
- Δείκτη (ιχνηθέτης μεγέθους) 100bp
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-acetate-EDTA (TAE)
- Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης ( loading buffer ). Το διάλυμα αυτό συνοδεύει τα κλάσματα, διευκολύνοντας τα να βυθιστούν μέσα στους θαλαμίσκους της γέλης και ταυτόχρονα να χρωματιστούν.



- Φθορίζουσα βαφή βρωμιούχου αιθιδίου
- Πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (Transiluminator)

Αρχικά, για την δημιουργία της γέλης (1% κ.β), διαλύθηκαν 1g σκόνης αγαρόζης σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE, και προστέθηκαν 3μl βρωμιούχου αιθιδίου για να μπορούν τα αμπλικόνια μετά την ηλεκτροφόρηση να φθορίζουν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Στην συνέχεια το μείγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου να διαλυθεί η αγαρόζη πλήρως. Το καυτό πλέον διάλυμα αγαρόζης χύνεται μέσα στη μήτρα για να στερεοποιηθεί και να δημιουργηθεί το πήκτωμα. Σημειώνεται πως θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί επαρκής ποσότητα διαλύματος αγαρόζης για πήκτωμα πάχους 3-4 mm. Αφού κρύωσε και είχε πλέον μετατραπεί σε συνεκτική μάζα, βυθίστηκε στο θάλαμο φόρτωσης σε πλήρη εμβάπτιση ρυθμιστικού διαλύματος TAE. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά το χτένι και άρχισε η διαδικασία φόρτωσης των αμπλικονίων. 20μl από κάθε αμπλικόνιο αναμίχθηκε με 8μl loading Buffer, και τα 28μl συνολικά μεταφέρθηκαν στους θαλαμίσκους φόρτωσης του πηκτώματος. Στον τελευταίο εναπομείναντα θαλαμίσκο φορτώθηκαν 3μl δείκτη (ιχνηθέτη μεγέθους). Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκίνησε με την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος στο σύστημα.

Τα αμπλικόνια του DNA έχουν αρνητικό συνολικό φορτίο έτσι όταν βρεθούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο πολώνονται και κινούνται προς την άνοδο μέσα από την γέλη. Όπως είναι φυσικό τα αμπλικόνια με μεγάλο μοριακό βάρος κινούνται πιο αργά μέσα από την γέλη, συγκριτικά με τα μικρότερα κλάσματα. Έτσι μετά την πάροδο χρόνου επιτυγχάνεται δυλισμός αυτών.

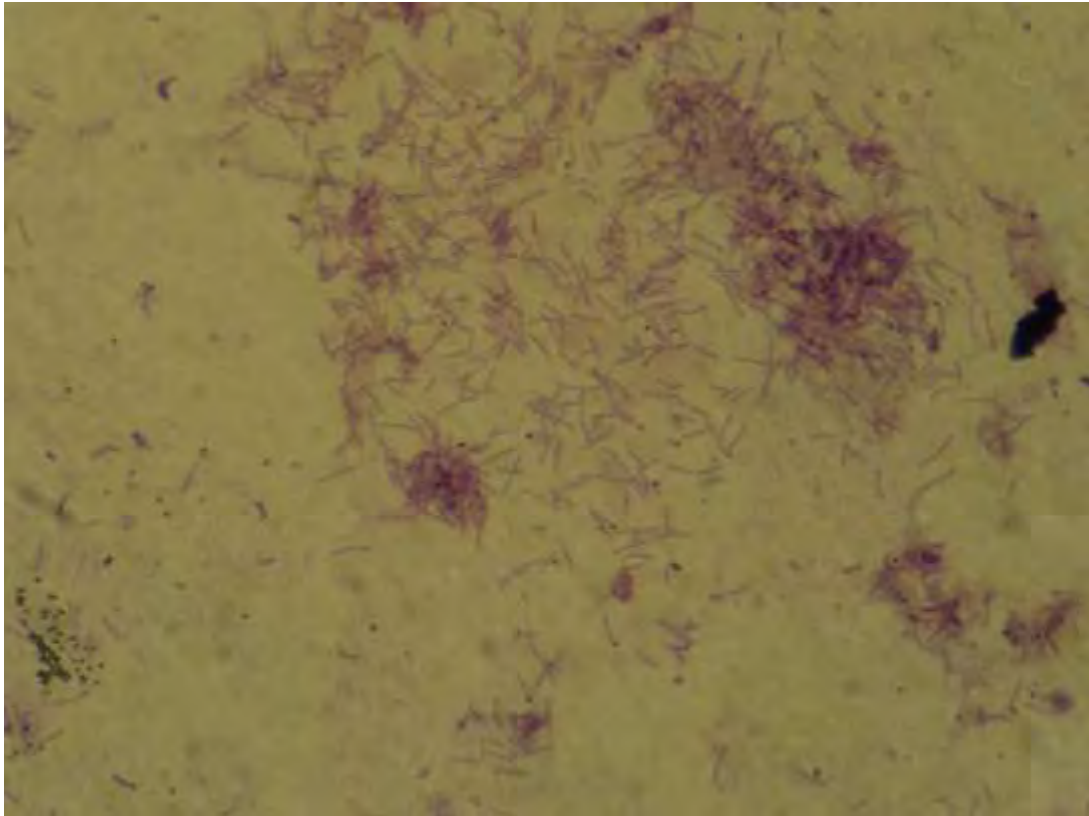
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρθηκε κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας όπου τα φθορίζοντα αμπλικόνια συγκρίθηκαν με τον δείκτη. Ο δείκτης αποτελούνταν από 15 διαφορετικού μοριακού βάρους κλάσματα μεταξύ 1000 και 5000 bp (πολλαπλάσια των 500bp). Το κλάσμα των 1000Kp φθόριζει σε τριπλάσιο βαθμό και έτσι συγκρίσιμα ήταν ακόμη ευκολότερος ο διαχωρισμός. Τα αμπλικόνια εκείνα που ήταν αρνητικά αυτόματα απορρίφθηκαν και η έρευνα πλέον συνεχίστηκε με την μελέτη μόνο των θετικών δειγμάτων. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρθηκε κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας 302nm για να εμφανιστούν τα φθορίζοντα αμπλικόνια. Με μια

χειρουργική λεπίδα προσεκτικά απομονώνεται η περιοχή του πηκτώματος που περιέχει το αμπλικόνιο του σωστού μεγέθους προσέχοντας να μην συμπαρασυρθούν παρακείμενα γενετικά θραύσματα είτε από την ίδια στήλη είτε από γειτονικές. Για τον διαχωρισμό και την τελική απόσταξη του DNA από την πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό QIAquick Gel extraction kit της Qiagen.

## **2.7 Αποτελέσματα**

### **2.7.1 Καλλιέργεια στελεχών**

Στο θρεπτικό υπόστρωμα F.M.M (Broth) παρουσιάστηκαν αρκετά προβλήματα κατά τις πρώτες καλλιέργειες. Κάθε φορά, αμέσως μετά την μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο, γινόταν μικροσκοπικός έλεγχος για μυξοβακτήρια σε νωπά δείγματα, όπου στην πλειονότητα των περιπτώσεων εντοπιζόνταν αρκετά μυξοβακτήρια. Ωστόσο, 24 ώρες μετά τις σπορές στα F.M.M και M.A με επώαση στους 25<sup>0</sup>C, όπως συνίσταται βιβλιογραφικά, εντοπιζόνταν σωρείες κινητών και ακίνητων βακτηρίων με σχήμα κόκκων- κοκκοβάκιλων χωρίς να εμφανίζονται μυξοβακτήρια. Επειδή το πρώτο συμβάν θεωρήθηκε τυχαίο, οι σπορές έγιναν για μια ακόμη φορά, επαναλαμβάνοντας το ίδιο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε και στην αρχή. Σε μικροσκοπικό έλεγχο μετά από 24 ώρες η εικόνα των νωπών παρασκευασμάτων ήταν όμοια, όντας αδύνατο να εντοπιστούν μυξοβακτήρια τόσο στο F.M.M Broth όσο και στο M.A.



**Εικόνα 3:** μυξοβακτήρια σε χρώση σαφρανίνης και μπλε του μεθυλενίου

Κατά την τρίτη απόπειρα καλλιέργειας, το πρωτόκολλο παρασκευής του θρεπτικού υποστρώματος F.M.M άλλαξε σε κάποια σημεία. Σύμφωνα με τον Razos (1996), το απιονισμένο νερό για την παρασκευή του F.M.M αντικαταστάθηκε με θαλασσινό κατά 100% ενώ συμπληρωματικά προστέθηκαν 15g/lit Άγαρ, μετατρέποντας το από στατικό υγρό σε γέλη. Οι спорές επώαστηκαν στους 19<sup>0</sup>C αντί για τους 25<sup>0</sup>C. Ο λόγος αυτής της αλλαγής στη θερμοκρασία επώασης έγινε επειδή τα περισσότερα κλινικά περιστατικά ψαριών ύποπτων σε μυξοβακτηρίαση, συλλέχθηκαν από κλωβούς/ δεξαμενές με θερμοκρασία νερού από 16<sup>0</sup>C- 19<sup>0</sup>C, πιθανολογώντας έτσι πως η προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες οφείλονταν σε αυτή την αλλαγή θερμοκρασίας. Κατά τη καλλιέργεια όμως 24 ώρες μετά, η εικόνα των νωπών επιχρισμάτων ήταν όμοια με τις προηγούμενες δύο περιπτώσεις.

Σύμφωνα με τον Avendano- Herrera (2008) τα μυξοβακτήρια είναι ανθεκτικά στις κινολόνες και στην Φλουμικίνη, Ενώ σύμφωνα με τον razos (1996) η χρήση Νεομυκίνης συνίσταται για την απομόνωση του βακτηρίου. Έτσι, κατά τη τελευταία προσπάθεια καλλιέργειας προστέθηκαν 10ml Flumequine συγκέντρωσης 400ppm και 4g/lit Νεομυκίνη τόσο στο M.A όσο και στο F.M.M. και επώαστηκαν στους 19<sup>0</sup>C.



**Εικόνα 4:** βέλη: αποικίες μυξοβακτηρίων σε F.M.M

Τα αποτελέσματα ήταν εμφανώς βελτιωμένα τόσο για το M.A όσο και για το F.M.M καθώς περιορίστηκε σημαντικά η παρουσία των κινητών βακτηρίων και κοκκοβάκιλων. Μετά από 48ώρες στο θρεπτικό υπόστρωμα M.A παρατηρήθηκαν αρκετές αποικίες μυξοβακτηρίων με μορφολογία παρόμοια με αυτή που περιγράφεται βιβλιογραφικά (Pazos et al 1996)(Εικόνα 4). Σε ότι αφορά όμως το θρεπτικό υπόστρωμα F.M.M οι αποικίες παρέκλιναν της μορφολογίας σε σύγκριση με εκείνη όπου περιγράφεται βιβλιογραφικά (Pazos 1996), καθώς οι αποικίες ήταν κυκλικές χωρίς άνισης προεκτάσεις. Στο M.A οι αποικίες ήταν στρογγυλές κίτρινες-ημιδιαφανείς ενώ στο F.M.M οι αποικίες ήταν υποκίτρινες- ημιδιαφανείς (εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** αριστερά: αποικία μυξοβακτηρίων σε F.M.M , δεξιά: αποικία μυξοβακτηρίων σε M.A

Το Marine Agar, συγκριτικά με το F.M.M, επέδειξε υποβαθμισμένη ικανότητα καλλιέργειας. καθώς σε μια περίπτωση δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυξοβακτηρίων (πίνακας 4). το F.M.M ωστόσο είχε καλύτερα αποτελέσματα από το M.A όταν όμως αυτό ήταν σε broth . Σε ότι αφορά το στέλεχος (**2.XL.EGG**) που προέρχονταν από αυγά, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά κατά τον μικροσκοπικό έλεγχο σε νωπά παρασκευάσματα οπότε και αποκλείστηκε από την μελέτη ενώ για τα στελέχη 4.SFK1.LV , 3KAN1.LV , 3KAN2.LV δεν ήταν δυνατή η απομόνωση των βακτηρίων. Επιπρόσθετα σε ότι αφορά το M.A , σε κάποια στελέχη ήταν δύσκολη η δημιουργία καθαρής αποικίας καθώς ακόμα και μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες, καθώς παρατηρούνταν μαζί με τα μυξοβακτήρια και έτερες βακτηριακές δομές οι οποίες ήταν επίσης ανθεκτικές στην Φλουμικίνη.

Εν κατακλείδι, η καλλιέργεια των μυξοβακτηρίων είναι αρκετά δύσκολη μιας και ο αργός ρυθμός ανάπτυξης που τα χαρακτηρίζει, δίνει την ευκαιρία σε λοιπά ευκαιριακά βακτήρια να υποστείλουν την ανάπτυξη τους. Είναι αναγκαία λοιπόν η χρήση κατάλληλου αντιβιοτικού όπου περιορίζει την ανάπτυξη τέτοιων ευκαιριακών βακτηρίων. Η φλουμικίνη η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία επέδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα σε συγκέντρωση 2mg/ l θρεπτικού υποστρώματος. Η ανακαλλιέργεια μπορεί να γίνει σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς αντιβιοτικό.

Πίνακας 4: Καλλιέργεια στελεχών σε υποστρώματα MA και FMM

ΚΩΔΙΚΟΣ	M.A	M.A+F	F.M.M	F.M.M+F	F.M.M+N	
1.SGK23.LV	x	x	*	✓	x	<p><b>Σημείωση: (*)</b> Παρατηρήθηκαν αποικίες παρόμοιες τόσο σε χρώμα όσο και υφή με εκείνες των μυξοβακτηρίων όπως προκύπτει βιβλιογραφικά (Pazos et al 1996) τα οποία ωστόσο καλύπτονταν από ανταγωνιστικές αποικίες διαφορετικής υφής και χρώματος</p> <p><b>Σημείωση: (N/A)</b> Δεν προέκυψαν μυξοβακτήρια κατά τον μικροσκοπικό έλεγχο</p> <p><b>Σημείωση: (✓)</b> Προέκυψε αποικισμός βακτηρίων τα οποία ήταν ανακαλυφτήσιμα</p> <p><b>Σημείωση: (x)</b> Δεν προέκυψε αποικισμός</p> <p><b>Σημείωση: F.M.M+F=</b>φλουμικίνη , <b>F.M.M+N=</b> +νεομικίνη, <b>M.A+F =</b> + φλουμικίνη</p>
1.SGK4.LV	x	x	*	✓	x	
1.PROPA9.TS	x	x	*	✓	x	
1.PROPB4.LV	x	x	*	✓	✓	
2.XL.EGG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
2.XL1.LV	✓	-	-	-	-	
2.XL2.LV	✓	-	-	-	-	
4.SFK1.LV	x	x	x	x	x	
4.SFK2.LV	x	x	x	✓	x	
4.SFK3.LV	x	x	x	✓	✓	
4.SFK4.LV	x	x	*	✓	x	
3.KAN1.LV	x	x	*	x	x	
3.KAN2.LV	x	x	x	x	x	
3.KAN3.LV	x	x	x	✓	x	
3.KAN4.LV	x	x	*	✓	x	

## 2.7.2 API 20 E

Πίνακας 5: Αποτελέσματα συστήματος ταυτοποίησης API 20E των 11 στελεχών συνολικά. ( - ) αρνητικό, ( + ) θετικό

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	McC	OF/o	OF/f
1.SGK23.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1.SGK4.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1.PROPA9.TS	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1.PROPB4.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2.XL1.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2.XL2.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4.SFK1.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4.SFK2.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4.SFK3.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
3.KAN3.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
3.KAN4.LV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-



## 2.7.3 API 20 NE

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα συντημάτων ταυτοποίησης API 20NE των 11 στελεχών συνολικά. (-) αρνητικό, (+) θετικό.

	NO <sub>3</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
1.SGK23.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1.SGK4.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1.PROPA9.TS	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1.PROPB4.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2.XL1.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2.XL2.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4.SFK1.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4.SFK2.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4.SFK3.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
3.KAN3.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
3.KAN4.LV	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

## 2.7.3 API ZYM

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα συστήματος ταυτοποίησης API ZYM των 11 στελεχών συνολικά. (-) αρνητικό, (+) θετικό.

	1. CNTRL	2. ALK	3. C <sub>4</sub>	4. C <sub>8</sub>	5. C <sub>14</sub>	6. ARYL	7. VAL	8. CYS	9. TRY	10. CHR	11. ACP	12. NP	13. α-gal	14. β- gsl	15. B-gluc	16. α-glu	17. β-glu	18. N-αβ	19. MAN	20. FUC
1.SGK23.LV	-	5	3	4	2	5	5	3	1	1	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
1.SGK4.IV	-	4-5	2	4	2	5	5	4	-	2	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
1.PROPA9.IT5	-	5	3	4	1	5	5	4	1	2	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
1.PROPB4.LV	-	5	3	4	2	5	5	3	1	1	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
2.XL1.LV	-	5	3	3-4	2	5	5	4	1	1	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
2.XI2.LV	-	5	3	4	2	5	5	4	1	1	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
4.SFK1.LV	-	5	3	4	2	5	5	4	1	2	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
4.SFK2.LV	-	5	2	4	1	5	5	4	1	1	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
4.SFK3.LV	-	5	2	4	1-2	5	5	4	-	2	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
3.KAN3.LV	-	5	3	3	2	5	5	3	1	1	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
3.KAN4.LV	-	5	3	4	2	5	5	4	1	1	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-

## 2.7.4 API 50 CH

Πίνακας 8: Αποτελέσματα συστήματος ταυτοποίησης API 50 CH των 11 σελέγχων συνολικά. (-) αρνητικό, (+) θετικό.

	1. GLY	2. ERY	3. DARA	4. LARA	5. R <sub>13</sub>	6. DXYL	7. LXYL	8. ADO	9. MDX	10. GAL	11. GLU	12. FRU	13. MNE	14. SBE	15. RHA	16. DUL	17. INO	18. MAN	19. SOR	20. MDM
<b>1.SGK23.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.SGK4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.PROPA9.TS</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.PROPB4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2.XL1.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2.XL2.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK1.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK2.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK3.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3.KAN3.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3.KAN4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

συνέχεια:

(συνέχεια) Πίνακας 8 : Αποτελέσματα συστήματος ταυτοποίησης API 50 CH των 11 στελεχών συνοδικά. (-) αρνητικό, (+) θετικό.

	21. MDG	22. NAG	23. AMY	24. ARB	25. ESC	26. SAL	27. CEL	28. MAL	29. LAC	30. MEL	31. SAC	32. TRE	33. INU	34. MLZ	35. RAF	36. AMD	37. GLYG	38. XLT	39. GEN	40. TUR
<b>1.SGK23.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.SGK4.IV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.PROPA9.TS</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.PROPB4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2.XL1.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2.XL2.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK1.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK2.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK3.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3.KAN3.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3.KAN4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

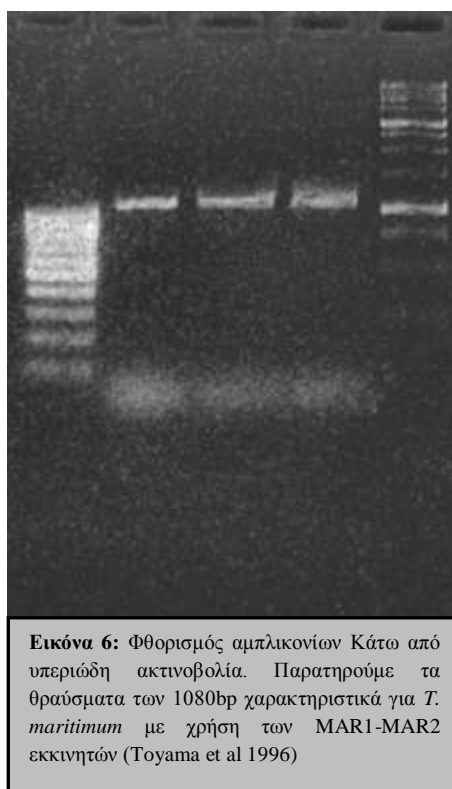
## συνέχεια:

(συνέχεια) Πίνακας 8 : Αποτελέσματα συστημάτων ταυτοποίησης API 50 CH των 11 στελεχών συνολικά. (-) αρνητικό, (+) θετικό.												
	41. LYX	42. TAG	43. DFUC	44. LFUC	45. DARL	46. LARL	47. GNT	48. 2KG	49. 5KG			
<b>1.SGK23.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.SGK4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.PROPA9.TS</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1.PROPB4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2.XL1.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2.XL2.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK1.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK2.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4.SFK3.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3.KAN3.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3.KAN4.LV</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 2.8 Συμπεράσματα

Σε ότι αφορά την καλλιέργεια των μυξοβακτηρίων η πραγματική βέλτιστη θερμοκρασία επώασης (19<sup>0</sup>C) ήταν διαφορετική από εκείνη που προτείνεται βιβλιογραφικά (25<sup>0</sup>C)(Pazos et al 1996, Avendano Herrera et al., 2004b). Όλα τα στελέχη *T. maritimum* από τα διάφορα σημεία του Ελλαδικού χώρου όπου συλλέχθηκαν παρουσίασαν καλύτερα αποτελέσματα όταν επώαστηκαν στους 19<sup>0</sup>C με προσθήκη φλουμικίνης 2mg/l θρεπτικού υποστρώματος. Το θρεπτικό υπόστρωμα F.M.M κατέφερε να καλλιεργήσει τα 9 από τα 15 στελέχη της έρευνας δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με το M.A.

Σε ότι αφορά τα βιοχημικά συστήματα API. Το βιοχημικό προφίλ ήταν παρόμοιο για όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως γεωγραφικού σημείου όπου εντοπίστηκαν, και του είδους όπου απομονώθηκαν. Στοιχεία που υπονοούν πως παρατηρείται μια ομοιογένεια στον Ελλαδικό χώρο σε ότι αφορά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του *T. maritimum*. Τα αποτελέσματα των βιοχημικών συστημάτων API συνάδουν με αυτά των προγενέστερων βιβλιογραφικών πηγών (Bernardet et al 1990, Suzuki et al 2001, Avendano –Herrera et al 2008, Wakayabashi et al 1986, Pazos et al 1990 ),



**Εικόνα 6:** Φθορισμός αμπλικονίων Κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Παρατηρούμε τα θραύσματα των 1080bp χαρακτηριστικά για *T. maritimum* με χρήση των MAR1-MAR2 εκκινητών (Toyama et al 1996)

Η απομόνωση του γενετικού υλικού και ταυτοποίηση μέσω PCR κρίνεται καταλληλότερη σε σύγκριση με τα API καθώς ο χρόνος ο οποίος απαιτείται μέχρι την ταυτοποίηση είναι μικρότερος. Τα βιοχημικά αντιδραστήρια API παρόλο που επέδειξαν ομοιογένεια αποτελεσμάτων για τα στελέχη *T. maritimum*, απαιτούν πολύ χρόνο (4-6 μέρες) έως ότου να προκύψουν τα αποτελέσματα του βιοχημικού προφίλ. Στον αντίποδα η ταυτοποίηση μέσω μοριακών τεχνικών PCR δεν απαιτεί την καλλιέργεια του παθογόνου σε θρεπτικά υποστρώματα αλλά γίνεται απευθείας λήψη μολυσμένου ιστού από τον φορέα. Έτσι ο χρόνος ταυτοποίησης μειώνεται κατά 24-48 ώρες ενώ υπολογίζεται πως συνολικά απαιτούνται 8 ώρες το μέγιστο, για την ταυτοποίηση. Το πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού από το *T. maritimum* όπως προκύπτει από τον Toyama (1996), είναι λειτουργικό καθώς κατάφερε να εμφανίσει μετά την PCR, αμπλικόνια μεγέθους 1088bp και για τα 11 στελέχη.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Altinok., I Kurt, I.** (2003) Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 3: 131-138.
- Avendano-Herrera, R., Magarinos, B., Lopez-Romalde, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E.** (2004a). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from marine fishes. *Dis. Aquat. Org.* 58:1-8.
- Avendano-Herrera, R., Magarinos, B., Toranzo, A.E., Beaz, R., Romalde, J.L.,** (2004b). Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 62, no. 1-2, p. 75-83.
- Avendaño-Herrera, R., Núñez, S., Magariños, B., Toranzo, A. E.** (2004c) A non-destructive method for rapid detection of *Tenacibaculum maritimum* in farmed fish using nested PCR amplification. *Bull. Eur. As. Fish Pathol.* 24(6).
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Magariños, B.** (2005) Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6947-6953.
- Avendano-Herrera, R., Irgang, R., Nunez, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E.** (2005) Recommendation of an Appropriate Medium for In Vitro Drug Susceptibility Testing of the Fish Pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 49: 82-87.
- Avendano- Herrera, R.** (2008) Identification of *Flexibacter maritimus* or *Tenacibaculum maritimum* from post-larvae of *Litopenaeus vannamei* ?. Comment on Mouriño et al. *Braz. J. Biol.*, 69: 225-226.
- Avendano-Herrera, R., Nunez, S., Barja, J.L., Toranzo, A.E.** (2008) Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to Enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms. *Aquacult Int* 16:1-11.
- Bader, J.A., Shotts, E.B.** (1998) Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. *J Aquat Anim Health* 10:311-319.
- Bartlett, J., Stirling, D** (2003) A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 226:3-6.
- Baxa, D, V., Kawai, K., Kusuda, R.** (1988). In vitro and in vivo activities of *Flexibacter maritimus* toxins. *Rep. Usa Mar. Biol.* 10:1-8.
- Bernardet, J.F.** (1986) '*Flexibacter columnaris*': first description in France and



comparison with bacterial strains from other origins *Dis. aquat. Org.* 6: 37-44.

**Bernardet, JF., Grimont, P.A.D.** (1989) Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev. and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masumura 1986. *Int J Syst Bacteriol* 39:346–354.

**Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA** (1990) *Flexibacter maritimus* is the agent of 'black patch necrosis' in Dover sole in Scotland. *Dis Aquat Org* 8:233–237.

**Cameron, D, E.** (1993). Evaluation of Amoxicillin for the therapy of salmonid cutaneous erosion disease. p129-131.

**Carson, J., Schmidtke, L, M., McCosh, P.** (1993). Asalmonid vaccine against *flexibacter maritimus* – dream or reality?. p113- 120.

**Carson, J., Schmidtke, L, M., Lewis, T.** (1994). Development of a vaccine against disease: results of efficacy testing of three types of vaccine. p 149-158.

**Cepeda, C., Garcia-Marcuez, S., Santos, Y.,** (2003) Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26:65-70.

**Chen, M.F., Henry-Ford, D., Groff, J.M.** (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health.* 7:318 326.

**Choi, D.H., Kim, Y.G., Hwang, C.Y., Yi, H., Chun, J., Cho, B.C.** (2006) *Tenacibaculum litoreum* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 635-640.

**Costenbader, C.J., Burchard, R.P.** (1978) Effect of Cell Length on Gliding Motility of *Flexibacter*. *Journal of Bacteriology* 133:1517-1519.

**Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L,C.** (1997) Shieh Medium Supplemented with Tobramycin for Selective Isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from Diseased Fish. *Journal of Clinical Microbiology.* 35:322–324.

**Desolme, J., Bernardet, F.** (1996) Freeze-drying of *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Flexibacter maritime*. *Dis Aquat Org* 27:77-80.

**Devesa, S., Barja, J, L., Toranzo, A, E.** (1989) Ulcerative skin and fin lesions in reared.turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. fish Dis.* 12: 323- 333.

**Dungan, C, F., Elston, R,A., Schiewe, M,H.** (1989) Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by cytophaga-like bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 55: 1128–1135.

**Ferguson, H,W., Delannoy, C,M,J., Nicolson, J., Sutherland, J., Crumlish, M., Hay, S.** (2009) jellyfish as vectors of bacterial disease for farmed salmon. *Nature precedings.*

- Frette, L., Jorgensen N,O,G., Irming, H., Kroer, N.** (2004) *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 519-524.
- Gelderen, R., Carson, J., Nowak, B.** (2009) Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against marine flexibacteriosis. *Aquaculture.* 288:7-13.
- González, S,F., Krug, M,J., Nielsen' M,E., Santos, Y., Call D,R.** (2004) Simultaneous Detection of Marine Fish Pathogens by Using Multiplex PCR and a DNA Microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 42:1414-1419.
- Handlinger, J., Soltani, M., Percival, S.** (1997) The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania , Australia . *Journal of Fish Diseases* 20: 159-168.
- Hansen, G. H., and J. A. Olafsen.** 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (**Hippoglossus hippoglossus**) eggs in marine aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.*55:1435-1446.
- Hansen, G. H., and R Sbrheim.** 1991. Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. *J. Microbiol.Methods* 13:231-241.
- Hansen., G. H., Bergh, Ø., Michaelsen, J., Knappskog. D.** (1992) *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a Pathogen of Eggs and Larvae of Atlantic Halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Int J Syst Bacteriol* 42:451-458.
- Heindl, H., Wiese, J., Imhoff, J,F.** (2008) *Tenacibaculum adriaticum* sp. nov., from a bryozoan in the Adriatic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58:542-547.
- Hikida, M., H. Wayabayashi, H. Egusa, and K. Masumura.** (1979). *Flexibacter* spp. A gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45:421–428.
- Hodgkin, J., Kaiser, D.** (1979). Genetics of gliding motility in *Myxococcus Xanthus* (*myxobacteriales*): genes controlling movement of single cells. *Molec. Gen. Genet.* 171:167-176.
- Hoiczuk, E.** (2000). Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Arch. Micro.* 174: 11-17.
- Holmes, B.** (1992) Synonymy of *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986 and *Cytophaga marina* Reichenbach 1989 *International Journal of Systematic Bacteriology.* 42:185.
- Jung, S,Y., Oh, T,K., Yoon, J,H.** (2006) *Tenacibaculum aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1577-1581.
- Kaiser, D.** (2000) Bacterial motility: How do pili pull?. *Curr. Biol.* 10:777-780.
- Kämpfer, P., Young, C,C., Sridhar, K,R., Arun, A,B., Lai, W,A., Shen, F T., Rekha, P, D.** (2006) Transfer of [*Flexibacter*] *sancti*, [*Flexibacter*] *filiformis*, [*Flexibacter*] *japonensis* and [*Cytophaga*] *arvensicola* to the genus *Chitinophaga* and description of *Chitinophaga skermanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:2223 – 2228.
- Kato, F., Ishimaru, K., Murata, O., Kumai, H.** (2006) The efficacy of immersion -

vaccination against gliding bacterial disease in red sea bream *Pagrus major* and Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Science* 55:97-101.

**Kato, F., Ishimaru, K., Murata, O., Kumai, H.** (2007) The efficacy of immersion-vaccination against gliding bacterial disease in red sea bream *Pagrus major*. *Animal Diseases* 73: 51-54.

**Komaki, H., Fudou, R., Iizuka, T., Nakajima, D., Okazaki, K., Shibata, D., Ojika, M., Harayama, S.** (2008) PCR Detection of Type I Polyketide Synthase Genes in Myxobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 74: 5571–5574.

**Kubilay, A., Altun, S., Diler, Ö., Ekici, S.** (2008) Isolation of *Flavobacterium columnare* from Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8: 165-169.

**Magariños, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J.L., Toranzo, A.E.** (1995) Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Dis Aquat Org* 21: 103–108.

**Magi, G.A., Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L.** (2006) First report of *Tenacibaculum maritimum* serotype O3 infection in cultured tub gurnard *Chelidonichthys lucernus* L. in Italy. *Ittiopatologia* 3: 113-119.

**Merz, A., Sheetz, M., So, M.** (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature.* 407:98-102.

**Mourino, J.L.P., Vinatea, L., Buglione-Neto, C., Ramirez, C.T., Vieira, F.N., Pedrotti, F., Martins, M.L., Demer, R.B., Aguilar, M.A., Beltrame, E.**, (2008) Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus* (Wakabayashi et al. 1986) in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *Braz Journal Of Biology* 68:173- 177.

**Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Lysenko, A.M., Park, M.S., Mikhailov, V.V., Bae, K.S., Park, H.Y.** (2005) *Roseivirga echinicomitans* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, and emended description of the genus *Roseivirga*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1797-1800.

**Nichols, C.M., Bowman, J.P., Guezennec, J.** (2005) *Olleya marilimosa* gen. nov., sp. nov., an exopolysaccharide-producing marine bacterium from the family *Flavobacteriaceae*, isolated from the Southern Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1557-1561.

**Noga, E, J.,** (2000) *Fish disease: diagnosis and treatment*. Blackwell publishing. pp187.

**Øivind, B.** Bacterial pathogens associated with early life stages of marine fish. (1999) *Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (ed) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

- Ostland, V, E., LaTrace, C., Morrison, D., Ferguson, H, W.** (1999) *Flexibacter maritimus* associated with bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *J. Aquat. Anim. Health* 11: 35-44.
- O'Sullivan L,A., Weightman, A,J., Fry, J,C.** (2002) New degenerate Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol.* 68:201-10.
- Pazos, F., Santos, Y., Macias, AR., Nuñez, S., Toranzo, A,E.** (1996) Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J Fish Dis* 19:193–197.
- Piñero-Vidal, M., Carballas, C,G., Barreiro, O,G., Riaza, A., Santos, Y.** (2008), *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 881-885.
- Piñero-Vidal, M., Riaza, A., Santos, Y.** *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 21-25.
- Powell, M,D., Carson, J., Van Gelderen, R.** (2005) Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum\_maritimum*. *Dis Aquat org* 61:179-185.
- Powell, M,D., Harris, J,O., Carson, J., Hill, J, V.,** (2005) ; Effects of gill abrasion and experimental infection with *Tenacibaculum maritimum* on the respiratory physiology of Atlantic salmon *Salmo salar* affected by amoebic gill disease. *Diseases of aquatic organisms* 63:169-174.
- Roberts, R, J.** (2001) *Fish Pathology*. 3<sup>rd</sup> Edition. W.B. Saunders publishing. pp 199.
- Romalde, J, L., Ravelo, C., Lopez- Romalde, S., Avendano- Herrera, R., Magarinos, B., Toranzo A, E.** (2005). Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for Spanish aquaculture. *Fish Vaccinology*. p85-89
- Salati, F., Cubadda, C., Viale, I., Kusuda, R.** (2005). Immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens, *Fish. Sci.*, 71: 563-567.
- Santos, Y., Pazos, F., Barja, J,L.** (1999) *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: Olivier G (ed) ICES identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish, No. 55. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, p 1–6.
- Scapeclaus, W.** (1992) *Fish diseases*. 2<sup>nd</sup> edition. Balkema publishing. pp 238.
- Sheu, S,Y., Lin, K,Y., Chou, J,H., Chang, P,S., Arun, A,B., Young, C,C., Chen, W,M.** (2007). *Tenacibaculum litopenaei* sp. nov., isolated from a shrimp mariculture pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1148-1153.
- Spormann, A.** (1999). Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus*

- Xanthus*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 621-641.
- Soltani, M., Munday, B.L., Burke, C.M.** (1996) The Relative Susceptibility of Some Species of Fish to Infections by Two *Flexibacter* species: *Flexibacter columnaris* and *Flexibacter maritimus*. Aquaculture, 140:259-264.
- Stewart, J.R., Brown, R.M.** (1970) Aligicidal nonfruiting myxobacteria with high G+C ratios. Archives of Microbiology 80: 176-190.
- Steinum, T., Sjøstad, K., Falk, K., Kvellestad, A., Colquhoun, D.J.** (2009) An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation. *Aquaculture* 293:172-179.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., Yamamoto, S.** (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 51: 1639–1652.
- Tanaka, T., Annaka, M., LLmann, F., Ishii, K., Kofufuta, E., Suzuki, A., Tokita, M.** (1992) Phase transitions of gels in mechanics of Swellings. 64: 683-703.
- Tanner, M.A., Coleman, W.J., Everett, C.L., Robles, S.J., Dilworth, M.R., Yang, M.M., Youvan, D.C.** (1999) Multispectral Bacterial Identification. *Biotechnology et alia* 6:1-9
- Toranzo A.E.** (2003) Report about fish bacterial diseases.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L.** (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61.
- Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H.** 1996. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology*, 31:25-31.
- Yoon, J.H., Kang, S.J., Oh, T.K.**(2005). *Tenacibaculum lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat in the Yellow Sea, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 793-798.
- Van Gelderen, R., Carson, J., Nowak B.** (2009). Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis, *Aquaculture* 288, 7-13.
- Vidal P, M., Riaza, A., Santos, Y.** (2008) *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 21-25.
- Virbickas, J., Jankauskiene, R., Arbačiauskiene, V., Kazlauskiene, N. Vosyliene, Z., Lukšiene, D.** Myxobacteriosis of juvenile Salmonidae - an indicator of their weakening physiological status. *Acta Zoologica Lituanica* 12: 65-69.
- Wakabayashi, H., Hikida, M., Masumura, K.,** (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International*

Journal of Systematic Bacteriology, 36:396-398.

**Wang, J.T., Chou, Y.J., Chou, J.H., Chen, C.A., Chen, W.M.** (2008) *Tenacibaculum aiptasiae* sp. nov., isolated from a sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58:761-766.

**Wilson, T., Carson, J.** (2003) Development of sensitive, high-throughput one-tube RT PCR enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 54:127- 134.

**Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D., Oster, G.** 2002. How myxobacteria glide. *Curr. Biol.* 12:369-377.

**Woo P. T. K., Bruno, D. W., Lim, L. H. S.** (2003) *Diseases And Disorders Of Finfish In Cage Culture*. Cabi publishing. pp 138.