

Περίληψη

Το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Pdp) είναι ένα βακτήριο που προκαλεί φωτοβακτηρίωση (pasteurellosis) στα ψάρια, μια σοβαρή ασθένεια της ιχθυοκαλλιέργειας με υψηλές θνησιμότητες. Το εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο προσφέρει μικρής διάρκειας προστασία, οδηγώντας συχνά σε εξάρσεις ακόμα και σε εμβολιασμένους πληθυσμούς. Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκαν πέντε στελέχη του Pdp για την αξιολόγηση της λοιμογονικότητας και του αντιγονικού τους προφίλ και για τον εντοπισμό πιθανών στόχων για την ανάπτυξη εμβολίου. Προνύμφες τσιπούρας μολύνθηκαν με τα στελέχη σε θερμοκρασίες 19°C και 23°C, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε πλήρης αλληλούχιση των γονιδιωμάτων τους, ακολουθούμενη από συγκριτική γονιδιωματική και πανγονιδιωματική ανάλυση. Με αυτό τον τρόπο, προσδιορίστηκαν λοιμογόνοι παράγοντες και ήταν εφικτή η αντιγονική αξιολόγηση μέσω αντίστροφης εμβολιολογίας. Διαπιστώθηκε ότι δύο από τα πέντε στελέχη εμφάνισαν μειωμένη λοιμογονικότητα *in vivo*, γεγονός που αποδόθηκε στην απουσία του πλασμιδίου που κωδικοποιεί την τοξίνη AIP56. Επιπλέον, εντοπίστηκαν 36 καλά συντηρημένες αντιγονικές πρωτεΐνες, κάποιες από τις οποίες με περαιτέρω επιλογή θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη ενός νέου αποτελεσματικότερου εμβολίου.

Εισαγωγή

Η φωτοβακτηρίωση είναι μια σοβαρή βακτηριακή ασθένεια στην ιχθυοκαλλιέργεια, που προκαλείται από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Pdp). Εκδηλώνεται κυρίως το καλοκαίρι ($\Theta > 23^{\circ}\text{C}$) με συμπτώματα όπως σκουρόχρωμες αλλοιώσεις, σπληνομεγαλία, πολυεστιακή νέκρωση και λευκά οζίδια σε εσωτερικά όργανα. Η αντιμετώπιση της γίνεται με αντιβιοτικά, των οποίων η αποτελεσματικότητα μειώνεται λόγω ανθεκτικότητας, ενώ ο εμβολιασμός προσφέρει μικρή διάρκεια προστασία. Οι κύριοι λοιμογόνοι παράγοντες του Pdp είναι η εξωτοξίνη AIP56, που προκαλεί απόπτωση στα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα του ξενιστή, η έκκριση σιδηροφόρων (πυσιβακτίνη) για δέσμευση σιδήρου από τον ξενιστή και η παρουσία κάψουλας πολυσακχαριτών, η οποία ενισχύει την παθογένεια και την επιβίωση του. Κύριος σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η αξιολόγηση της λοιμογονικότητας και του αντιγονικού προφίλ πέντε στελεχών του βακτηρίου Pdp.



Εικόνα 1. Τυπική κλινική εικόνα της φωτοβακτηρίωσης: λαβράκι με αναιμικά βράγχια, φλεγμονή του ήπατος, σπληνομεγαλία και λευκά οζίδια στο σπλήνα (Varvirigos, 2020)

Υλικά και Μέθοδοι

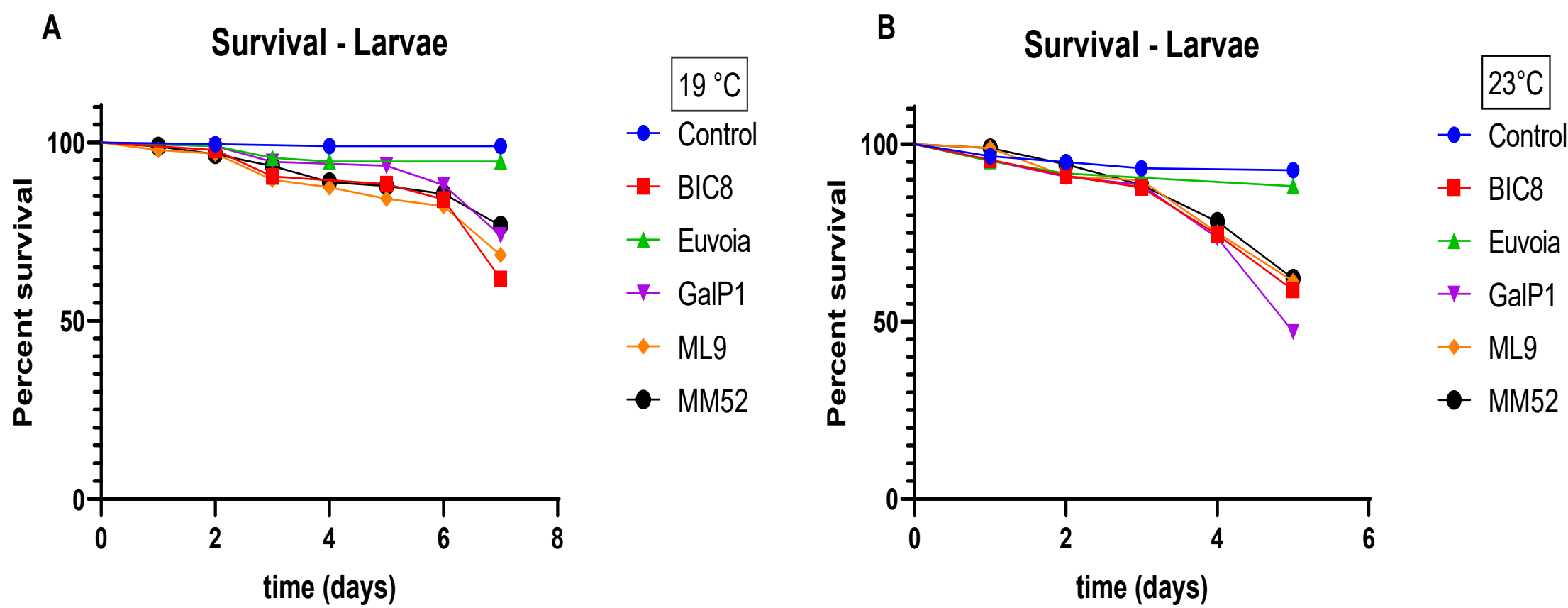
Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά στελέχη του Pdp από τη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ, τα οποία είχαν διαφορετικά χαρακτηριστικά απομόνωσης. Η λοιμογονικότητα τους αξιολογήθηκε με *in vivo* δοκιμή, όπου γονιμοποιημένα αυγά τσιπούρας τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες 96 θέσεων (1 αυγό/θέση) και μετά την εκκόλαψη τους, οι προνύμφες μολύνθηκαν με βακτηριακά εναιωρήματα (10^6 CFU/mL). Διεξήχθησαν έξι δοκιμές (μία control, πέντε με στελέχη) σε 19°C (7 ημέρες) και 23°C (5 ημέρες), με ημερήσια καταγραφή θνησιμότητας. Τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία καμπύλων επιβίωσης Kaplan-Meier και για στατιστική ανάλυση (Mantel-Cox test). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Oxford Nanopore long reads) για τη σύγκριση γονιδιωμάτων των στελεχών, ενώ μέσω εργαλείων βιοπληροφορικής, πραγματοποιήθηκε πανγονιδιωματική ανάλυση και εντοπίστηκαν συντηρημένες αντιγονικές πρωτεΐνες.

Αποτελέσματα

Η μελέτη ανέδειξε τη σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στη λοιμογόνο δράση του Pdp, με τη μεγαλύτερη παθογένεια να καταγράφεται στους 23°C. Η στατιστική ανάλυση Mantel-Cox έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές όλων των στελεχών από το control ($P < 0,05$) και στις δύο θερμοκρασίες, εκτός από το στέλεχος Ευνοία στους 23°C. Παράλληλα, η συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε ότι στα στελέχη Ευνοία και MM52, τα οποία εμφάνισαν τη χαμηλότερη λοιμογονικότητα στην *in vivo* δοκιμή, απουσίαζε το πλασμίδιο rPHDP10, το οποίο κωδικοποιεί την τοξίνη AIP56. Σε όλα τα στελέχη εντοπίστηκε το πλασμίδιο (rPHDP70) που κωδικοποιεί την πυσιβακτίνη αλλά και το οπερόνιο που κωδικοποιεί την κάψουλα πολυσακχαριτών. Ακόμη, αναγνωρίστηκαν συνολικά 51 διαφορετικές αντιγονικές πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται όλες στην εξωτερική μεμβράνη. Οι 42 από αυτές υπάρχουν σε όλα τα στελέχη, εκ των οποίων οι 36 είναι καλά συντηρημένες και οι αλληλουχίες τους ταυτίζονται απόλυτα.

Πίνακας 1. : Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και τα δεδομένα απομόνωσης τους.

Στέλεχος	Περιοχή	Είδος Ξενιστή	Έτος
BIC8	Κύπρος	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2022
Euvoia	Εύβοια	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2013
GalP1	Γαλαξίδι	<i>Sparus aurata</i>	2021
ML9	Λέρος	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2023
MM52	Σαρωνικός κόλπος	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2021



Εικόνα 2. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier από της δοκιμή με τις προνύμφες τσιπούρας. Α) Η δοκιμή στους 19°C με διάρκεια 7 ημέρες. Β) Η δοκιμή στους 23°C με διάρκεια 5 ημέρες.

Συζήτηση

Η μεγαλύτερη λοιμογονικότητα που παρατηρήθηκε στους 23 °C σε σύγκριση με τους 19 °C ήταν αναμενόμενη, δεδομένου ότι η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου είναι πάνω από 22°C. Παρόλα αυτά επιβεβαιώθηκε η ικανότητα του να μολύνει και σε θερμοκρασία μικρότερη της ιδανικής. Η γονιδιωματική ανάλυση έδειξε ότι στα στελέχη Ευνοία και MM52 που στην *in vivo* δοκιμή είχαν μειωμένη λοιμογονικότητα απουσίαζε το πλασμίδιο rPHDP10 που κωδικοποιεί την τοξίνη AIP56. Παρόλα αυτά δεν σημαίνει ότι τα στελέχη είναι μη λοιμογονικά, δεδομένου ότι είχαν απομονωθεί από νοσούντα ψάρια. Η λοιμογονικότητα τους απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Η υψηλή γενετική σταθερότητα του Pdp που επιβεβαιώνεται και από τον υψηλό αριθμό συντηρημένων πρωτεϊνών, πιθανώς δικαιολογεί τη διατήρηση του ίδιου εμβολίου όλα αυτά τα χρόνια, καθώς τα στελέχη δεν παρουσιάζουν σημαντικές γονιδιωματικές διαφοροποιήσεις. Ωστόσο, η παρουσία κάψουλας πολυσακχαριτών, που εντοπίστηκε σε όλα τα στελέχη, ενδεχομένως να περιορίζει την αποτελεσματικότητα των υφιστάμενων εμβολίων. Σ' αυτές τις περιπτώσεις εμβόλια που έχουν ως βάση αντιγονικές πρωτεΐνες είναι ίσως καταλληλότερα. Με περαιτέρω έρευνα και επιλογή, ορισμένες από τις 36 καλά συντηρημένες αντιγονικές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους στόχους για την ανάπτυξη ενός νέου, αποτελεσματικότερου εμβολίου έναντι της φωτοβακτηρίωσης.

Συμπεράσματα

Η μελέτη επιβεβαίωσε τη σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στη λοιμογονικότητα του Pdp, με ισχυρότερη δράση στους 23°C. Η μειωμένη λοιμογονικότητα δύο στελεχών πιθανώς αποδίδεται στην απουσία του πλασμιδίου rPHDP10 που κωδικοποιεί την τοξίνη AIP56. Η υψηλή γενετική ομοιογένεια των στελεχών αντανακλάται στο αντιγονικό τους προφίλ, με 36 συντηρημένες πρωτεΐνες στην εξωτερική μεμβράνη, κάποιες εκ των οποίων θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους στόχους για νέα εμβόλια κατά της φωτοβακτηρίωσης.

Αναφορές

- Andreoni, F., & Magnani, M. (2014). Photobacteriosis: Prevention and diagnosis. In Journal of Immunology Research (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/793817>
- Panini, E. B., Mylonas, C. C., Zanuy, S., Carrillo, M., Ramos, J., & Bruce, M. P. (2001). Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. In Aquaculture International (Vol. 9).
- Romalde, J. L. (2002). Photobacterium damsela subsp. piscicida: An integrated view of a bacterial fish pathogen. In International Microbiology (Vol. 5, Issue 1, pp. 3–9). Sociedad Española de Microbiología. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0051-6>
- Varvirigos P. 10. Photobacterium damsela subsp. piscicida. In : Zmic S. (ed.). Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture. Zaragoza : CIHEAM, 2020. p. 83-96 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 75)