

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 59, No 4 (2008)



### Fish vaccination

P. PAPADOPOULOS (Π. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ), K. BITCHAVA (Κ. ΜΠΙΤΧΑΒΑ), E. TZIRONI (Ε. ΤΖΙΡΩΝΗ), F. ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.14965](https://doi.org/10.12681/jhvms.14965)

### To cite this article:

PAPADOPOULOS (Π. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ) P., BITCHAVA (Κ. ΜΠΙΤΧΑΒΑ) K., TZIRONI (Ε. ΤΖΙΡΩΝΗ) E., & ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ) F. (2017). Fish vaccination. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 59(4), 308–319. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14965>

## ■ Fish vaccination

**P. Papadopoulos, K. Bitchava, E. Tzironi, F. Athanassopoulou**

*Laboratory of Ichthyology & Fish Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly*

## ■ Εμβολιασμός ιχθύων

**Π. Παπαδόπουλος, Κ. Μπιτσαβά, Ε. Τζιρώνη, Φ. Αθανασοπούλου**

*Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**ABSTRACT.** In intensive fish rearing system, fish are kept in high densities and their chance to be exposed to micro organisms that can cause infection, such as bacteria, parasites or viruses, is very high. Under these circumstances, the problem of infectious diseases is becoming very important and has significant results. Bacterial and viral diseases of the cultured fish species have led to high mortalities and have decreased the income of the fish farming industries. There are many examples in the Mediterranean Sea, in the production of sea bream (*Sparus aurata*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and many other cultured fish species. In the last years, this production has been followed by important outbreaks of known diseases and also by the appearance and identification of new ones. Until recently, for the control of the bacterial and parasite diseases, only antibiotics and chemical products were used that often demonstrated side effects, like residues in the fish muscle, development of resistance to the antibiotics and environmental pollution. Moreover, for the viral diseases, for which there is no treatment, the onset of the disease usually demands the destruction of the infected population. All the above, showed that there was a need to find methods to prevent the infection of the fish populations and this led to the development of vaccines. At the beginning, vaccines were produced only for the most common diseases and were easy to prepare bacterial vaccines, for example for vibriosis, furunculosis and red mouth disease (ERM). Nowadays, the production of new and more effective vaccines has began, even for diseases that are caused by viruses, like the subunit vaccines, the live recombinant and the genetic vaccines.

**Keywords:** vaccines, Mediterranean, aquaculture

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Στις υδατοκαλλιέργειες, σύμφωνα με το εντατικό σύστημα εκτροφής, τα ψάρια εκτρέφονται σε υψηλές ιχθυοπυκνότητες και η πιθανότητα έκθεσής τους σε μικροοργανισμούς, που προκαλούν νοσήματα, όπως βακτήρια, παράσιτα ή ιοί, κατά τη διάρκεια του παραγωγικού κύκλου, είναι πολύ υψηλή. Βακτηριδιακά και ιογενή νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών έχουν προκαλέσει υψηλές θνησιμότητες και έχουν μειώσει τα οικονομικά έσοδα της βιομηχανίας των ιχθυοκαλλιεργειών. Τα παραδείγματα είναι πολλά. Στη Μεσόγειο, τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή της τσιπούρας (*Sparus aurata*), του λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*), καθώς και διαφόρων άλλων, νέων, εκτρεφόμενων ειδών, έχει συνοδευτεί από σοβαρές εξάρσεις γνωστών νοσημάτων, καθώς και από την εμφάνιση και αναγνώριση νέων. Μέχρι πρόσφατα, για τον έλεγχο των βακτηριδιακών και παρασιτικών νοσημάτων χρησιμοποιούνταν αποκλειστικά μόνο αντιβιοτικά και χημικά προϊόντα, τα οποία όμως συχνά εμφανίζουν ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως κατάλοιπα στη σάρκα των ψαριών, ανθεκτικότητα αντοχής των βακτηριδίων και μόλυνση του υδάτινου περιβάλλοντος. Επιπρόσθετα, για ιογενείς ασθένειες, για τις οποίες δεν υπάρχει θεραπεία, η εμφάνιση της ασθένειας στις εγκαταστάσεις των μονάδων συνήθως απαιτεί την καταστροφή του προσβεβλημένου πληθυσμού. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην ανάγκη αναζήτησης μεθόδων πρόληψης των νοσημάτων και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη και χρήση εμ-

*Correspondence:* F. Athanassopoulou

Laboratory of Ichthyology & Fish Pathology, School of Health Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 431 00 Karditsa, Greece, e-mail: eathan@vet.uth.gr

*Αλληλογραφία:* Φ. Αθανασοπούλου

Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, 431 00, Καρδίτσα, e-mail: eathan@vet.uth.gr

*Submission date:* 26.01.2009

*Approval date:* 01.05.2009

*Ημερομηνία υποβολής:* 26.01.2009

*Ημερομηνία εγκρίσεως:* 01.05.2009



βολίων για την αντιμετώπιση των σοβαρότερων νοσημάτων των εκτρεφόμενων ψαριών. Έτσι, αρχικά παρασκευάστηκαν εμβόλια μόνο για νοσήματα που ήταν κοινά σε πολλές ιχθυοπαραγωγικές χώρες και ήταν εύκολα ελεγχόμενα με απλά προετοιμασμένα βακτηριακά εμβόλια, π.χ. η δονακίωση, η ερυθροστοματίτιδα (ERM) και η δοθεινώση. Σήμερα, όμως, έχει ήδη αρχίσει η παραγωγή νέων και περισσότερο αποτελεσματικών εμβολίων, ακόμα και για νοσήματα που οφείλονται σε ιούς, όπως είναι τα εμβόλια υπομονάδων, τα ζωντανά ανασυνδυασμένα εμβόλια και τα γενετικά εμβόλια.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** εμβόλια, ευρύαλα ψάρια, υδατοκαλλιέργειες

*Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με ειδίκευση στα «Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών».*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα πρώτα εμβόλια για την πρόληψη των βακτηριακών μολυσματικών ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1970 και εισήχθησαν στην υδατοκαλλιέργεια στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Την ίδια περίοδο η δημοτικότητα της αντιβιοτικής θεραπείας άρχισε να μειώνεται, καθώς η συχνότητα των περιπτώσεων αντοχής των βακτηριδίων στα αντιβιοτικά και η εμφάνιση παθογόνων ιών για τα ψάρια αυξάνονταν (Evelyn 1997). Από την προοπτική της υγείας των ψαριών, ο εμβολιασμός είναι προτιμότερος από τη θεραπεία με ουσίες λόγω της προληπτικής προσέγγισης ελέγχου των ασθενειών έναντι της αντίστοιχης θεραπευτικής που προσφέρουν τα αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά είναι πολύ ακριβά και προσφέρουν μόνο μικρής διάρκειας προστασία απαιτώντας πολλαπλές επαναλήψεις, ενώ αντίθετα τα εμβόλια μπορούν να εξασφαλίσουν μεγάλης διάρκειας προστασία με μία ή δύο το πολύ εφαρμογές (Ellis 1985), κάτω από εντατικές συνθήκες εκτροφής (Adams et al. 1997). Έτσι, με την εφαρμογή των εμβολιασμών επιτεύχθηκε η μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών (Midtlyng et al. 1996a), και κατά συνέπεια η μείωση του κόστους παραγωγής στις μονάδες υδατοκαλλιέργειών και η παραγωγή τελικών προϊόντων πολύ καλύτερης ποιότητας. Η αποτελεσματικότητα των εμβολιασμών που εφαρμόζονται σήμερα στα ψάρια, τόσο ως προς το βαθμό ανοσίας που επιτυγχάνεται όσο και ως προς τη διάρκεια αυτής της ανοσίας, εξαρτάται από πολλούς και ποικίλους παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς τους παράγοντες είναι η μέθοδος χορήγησης των εμβολίων, η φύση του αντιγόνου που χρησιμοποιείται, η χρήση εκδόχων, η δόση του εμβολίου (και στην περίπτωση του εμβολιασμού με τη μέθοδο της εμφάνισης ο χρόνος έκθεσης στο

εμβόλιο), το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών, η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών, η θρεπτική τους κατάσταση και η θερμοκρασία του νερού (Fender and Amend 1978, Tatner et al. 1983, Tatner and Manning 1987, Lillehaug et al. 1993, Nakanishi and Ototake 1997, Zapata et al. 1997).

## ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών χαρακτηρίζεται από την έμφυτη, φυσική ή μη ειδική άμυνα και την επίκτητη ή ειδική άμυνα. Την πρώτη διαθέτουν όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών, εκ γενετής και απαρτίζεται από κυτταρικά και χυμικά συστατικά, ενώ η δεύτερη σχετίζεται με την παραγωγή αντισωμάτων μέσω μιας ειδικής αναγνώρισης των διαφόρων αντιγόνων και περιλαμβάνει και ορισμένα κυτταρικά στοιχεία. Η σημασία αυτών των δύο συστημάτων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ηλικία των ψαριών και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Στους τελόστεους ιχθύες, το ανοσοποιητικό σύστημα συντίθεται από υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων, που περιλαμβάνουν τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα θρομβοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα μη ειδικά κυτταροτοξικά κύτταρα (Olabeuena 2000).

Αν και πολλά θέματα, σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, παραμένουν αδιευκρίνιστα, οι γνώσεις που έχουμε μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε ότι τα ψάρια διαθέτουν τους βασικούς μηχανισμούς και τις δομές που συναντούμε στο ανοσοποιητικό σύστημα των ανώτερων σπονδυλωτών (Warr 1997). Ωστόσο, οι ομοιότητες που υπάρχουν με το ανοσοποιητικό σύστημα των πτηνών και των θηλαστικών δεν συνεπάγονται ότι τα ψάρια έχουν την ίδια ανοσολογική αντίδραση με εκείνη των πτηνών και των

**Πίνακας 1.** Διαφορές του ανοσοποιητικού συστήματος μεταξύ των ανώτερων σπονδυλωτών (Teruyuki 2003).**Table 1.** Differences of immunological systems between higher vertebrates (Teruyuki 2003).

	ΨΑΡΙΑ			ΠΤΗΝΑ	ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ
	Κυκλόστομα	Ελασμοβράγχια	Τελεόστεα		
Επίδραση της θερμοκρασίας	•	•	•	○	○
Παραγωγή αντισωμάτων	○	•	•	•	•
Απόρριψη μοσχεύματος	•(Χρόνια)	•(Χρόνια)	•(Οξεία)	•(Οξεία)	•(Οξεία)
Ανοσολογική μνήμη	•	•	•	•	•
Μεικτή αντίδραση λευκοκυττάρων	•	•	•	•	•
Αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή	○	;	•	•	•
Ανοσοσφαιρίνες	○	IgM,X,R,W	IgM,D	IgM,Y,A	IgM,G,A,D,E
Υποδοχείς T-κυττάρων	○	•	•	•	•

• / ○ : ναι / όχι

θηλαστικών (Πίνακας 1). Μια κύρια διαφορά μεταξύ των ψαριών και των ανώτερων σπονδυλωτών είναι το γεγονός ότι τα ψάρια είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί. Έτσι, το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών επηρεάζεται έντονα από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η ανοσολογική ανταπόκριση μέσω των T βοηθητικών κυττάρων, καθώς και η κυτταροτοξική δράση των μη ειδικών κυτταροτοξικών κυττάρων επιβραδύνεται σε θερμοκρασίες κάτω από τους 4 °C (Le Morvan et al. 1998).

Η αντίσταση σε μια αρχική μόλυνση και η ανάρρωση από αυτήν, στα ψάρια, είναι το αποτέλεσμα μιας σύνθετης αλληλεπίδρασης μεταξύ μη ειδικών και ειδικών αμυντικών μηχανισμών. Η επίκτητη ανοσία σε επαναμολύνσεις πραγματοποιείται μέσω λεμφοκυττάρων και επιτυγχάνεται κυρίως μέσω αντισωμάτων, τα οποία μπορούν να εξουδετερώσουν ιούς, να διευκολύνουν τη φαγοκυττάρωση των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της δράσης των οψονινών και να ενεργοποιήσουν το συμπλήρωμα μέσω της κλασικής οδού (Sakai 1984). Μόνο μια κλάση αντισωμάτων έχει βρεθεί στους τελόστεους ιχθύες, που αντιστοιχεί στην IgM κλάση των θηλαστικών (Dorson 1981, Ellis 1989). Η IgM των ψαριών είναι συνήθως τετραμερής, αντίθετα προς την πενταμερή δομή της IgM των θηλαστικών. Ο ρόλος των αντισωμάτων των ψαριών στην ανάρρωση από τις διάφορες ασθένειες δεν έχει μελετηθεί σε βάθος, ωστόσο μέσω των εμβολιασμών μπορούμε να πετύχουμε υψηλές τιμές εξουδετερωτικών ή συγκολλητικών αντισωμάτων, που παρέχουν πλήρη προστασία απέναντι σε ορισμένες λοιμώξεις (Ellis 1989).

Η παρουσία της IgM των ψαριών δεν περιορίζεται μόνο στον ορό του αίματος. Αντισώματα υπάρχουν και στη βλέννα που καλύπτει τα επιθηλιακά κύτταρα των ψαριών, τα οποία είναι πιθανότερο να παράγονται τοπικά παρά να μεταφέρονται μέσω του ορού (Fletcher and White 1973, Lobb and Clem 1981, Peleteiro and Richards 1985). Μετά από εμβολιασμό εναντίον διαφόρων ειδών *Vibrio*, παρατηρείται παραγωγή ειδικών αντισωμάτων στον ορό, που αποτελούν ένδειξη προστασίας ενάντια στη νόσο. Συχνά, όμως, κάποιου βαθμού προστασία παρατηρείται και σε ψάρια στα οποία δεν ανιχνεύονται αντισώματα στον ορό (Croy and Ament 1977). Αυτή η προστασία μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής αντισωμάτων της βλέννας εναντίον των ειδών *Vibrio*, που έχουν βρεθεί σε ψάρια με μικρή ή καθόλου παρουσία αντισωμάτων στον ορό (Fletcher and White 1973, Kawai et al. 1981).

Ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων και οι τίτλοι των αντισωμάτων, μετά από την επίδραση ενός παθογόνου μικροοργανισμού, χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να φτάσουν σε επιθυμητά επίπεδα σε σχέση με τα θηλαστικά, και επιπλέον οι τίτλοι των αντισωμάτων είναι πιο χαμηλοί σε περίπτωση επαναμόλυνσης σε σχέση με τους αντίστοιχους της αρχικής λοίμωξης (Ellis 1989). Η επίκτητη ανοσία στα ψάρια φαίνεται ότι είναι παροδικής φύσεως, ωστόσο, μπορεί να διατηρηθεί ακόμα και για περισσότερο από ένα χρόνο μετά τον εμβολιασμό (Johnson et al. 1982, Paterson et al. 1981) και πιθανόν και για ακόμα μεγαλύτερο διάστημα, σε περίπτωση που έπεται μίας οξείας νόσου.



## ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ

Κάθε εμβολιασμός που εφαρμόζεται στα ψάρια πρέπει να διέπεται από κάποιες βασικές αρχές. Έτσι, ο εμβολιασμός πρέπει να γίνεται μόνο σε υγιή ψάρια, τα οποία δεν βρίσκονται σε κατάσταση καταπόνησης. Ψάρια τα οποία υποφέρουν από κάποιο νόσημα ή υπέστησαν πρόσφατα διάφορους χειρισμούς δεν ενδείκνυται να εμβολιάζονται. Πριν τον εμβολιασμό τα ψάρια πρέπει να στερούνται της τροφής έτσι ώστε ο πεπτικός σωλήνας να είναι άδειος. Με τη νηστεία πετυχαίνουμε τη μείωση της καταπόνησης των ψαριών λόγω των χειρισμών και της καλύτερης ανταπόκρισης στα αναισθητικά. Επιπρόσθετα, ο εμβολιασμός πρέπει να γίνεται σε υγιές περιβάλλον, να αποφεύγεται η έκθεση των ψαριών σε νοσήματα και η μετακίνησή τους σε δυνητικά παθογόνο περιβάλλον για περίπου δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό, όταν η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται γύρω στους 15°C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες νερού, απαιτείται μικρότερο χρονικό διάστημα για την εγκατάσταση της ανοσίας (Varvarigos 2003).

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Η χορήγηση των εμβολίων στα ψάρια μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, από τις οποίες οι κυριότερες είναι με ένεση, με εμφύσηση ή με χορήγηση από το στόμα. Οι μέθοδοι αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την καταπόνηση (stress) και τους χειρισμούς που υφίστανται τα ψάρια κατά την εφαρμογή των εμβολιασμών, καθώς και ως προς τον χρόνο και την εργασία που απαιτείται για την εφαρμογή τους.

Η χορήγηση εμβολίων από το στόμα, με αντιγόνο που ενσωματώνεται στην τροφή (Εικ. 1), θα ήταν η ιδανική μέθοδος για τον εμβολιασμό των ψαριών και σήμερα έχουν ήδη αναπτυχθεί τέτοια εμβόλια. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος αυτή έχει το εξής μειονέκτημα: ο βαθμός προστασίας που επιτυγχάνεται είναι μικρός και η ενσωμάτωση του εμβολίου στην τροφή είναι ακριβή και καταναλώνει μεγαλύτερη ποσότητα εμβολίου σε σχέση με τις μεθόδους της εμφύσησης και της ένεσης (Press and Lillehaug 1995). Για να είναι επιτυχής αυτή η μέθοδος χρειάζεται συνήθως και αναμνηστική δόση. Για την προστασία του εμβολίου από τη δράση των οξέων της πεπτικής οδού και την αποφυγή υποβάθμισής του έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές, οι οποίες εξελίσσονται, όπως η εγκύστωση του αντιγόνου μέσα σε λιποσώματα ή αλγινικά κύτταρα (Ire et al. 2005, Maurice et al. 2004), η ουδετεροποίηση



**Figure 1.** Food with incorporated antigen for administration of vaccines per os (Cedric K et al 2004).

**Εικόνα 1.** Τροφή με ενσωματωμένο αντιγόνο, για χορήγηση εμβολίων από το στόμα (Cedric K et al 2004).

των γαστρικών εκκρίσεων ή η εφαρμογή εμβολίων biofilm (Azad et al. 2000).

Ο εμβολιασμός με τη μέθοδο της εμφύσησης είναι μια καθιερωμένη πρακτική στις υδατοκαλλιέργειες και χρησιμοποιείται για παράδειγμα σε εμπορικά εμβόλια για παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως τα *Vibrio* spp. και το *Photobacterium damsela* spp. (Horne 1997). Η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρήσιμη για μαζικούς εμβολιασμούς ψαριών και ειδικότερα μικρών ψαριών. Τα ψάρια βυθίζονται για 20-30 δευτερόλεπτα σε δεξαμενή που περιέχει το διαλυμένο εμβόλιο και κατά συνέπεια ο χρόνος που διαρκεί ο εμβολιασμός είναι μικρός και ελαχιστοποιεί την καταπόνηση που υφίστανται τα ψάρια (Press and Lillehaug 1995). Το εμβόλιο εφαρμόζεται εξωτερικά στα ψάρια χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές, που περιλαμβάνουν τον ψεκασμό, την άμεση εμφύσηση και την έκθεση της σάρκας (Anderson et al. 1983). Το αντιγόνο στη συνέχεια εισέρχεται στο σώμα των ψαριών μέσω του δέρματος ή των βραγχίων. Η συγκέντρωση του εμβολίου στη δεξαμενή και η διάρκεια της έκθεσης των ψαριών είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες, που επηρεάζουν την τελική ανοσία. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της εμφύσησης είναι ότι η είσοδος του εμβολίου στον οργανισμό των ψαριών γίνεται από τις ίδιες οδούς που χρησιμοποιούν πολλοί παθογόνοι παράγοντες, ενεργοποιώντας έτσι και την τοπική ειδική ανοσία της βλέννας, όπου για παράδειγμα,



**Figures 2-3.** A part of the fish in the tank is separated, an anaesthetic is added and oxygen is supplied. Then small groups of fish are transferred with a small net into the vaccine dilution (Varvarigos P 2003).

**Εικόνες 2-3.** Ένα μέρος των ψαριών της δεξαμενής διαχωρίζεται, προστίθεται αναισθητικό και γίνεται παροχή οξυγόνου. Στη συνέχεια, μικρές ομάδες ψαριών μεταφέρονται με τη βοήθεια απόχης στο διάλυμα του εμβολίου (Varvarigos P 2003).



είναι πολύ πιθανή η συνάντηση με έναν παθογόνο παράγοντα (Dos Santos et al. 2001, Gudding et al. 1999, Lobb 1987, Lumsden et al. 1993). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα. Χρησιμοποιεί μεγαλύτερη ποσότητα εμβολίου και η διάθεση, στη συνέχεια, του περισσευούμενου εμβολίου δημιουργεί πρόβλημα (Austin 1984). Η συστηματική ανοσολογική ανταπόκριση που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της εμβάπτισης είναι γενικά λιγότερο έντονη και μικρότερης διάρκειας σε σχέση με αυτήν που επιτυγχάνεται μέσω του εμβολιασμού με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Nakanishi and Ototake 1997).

Η διαδικασία του εμβολιασμού με άμεση εμβάπτιση περιλαμβάνει τον διαχωρισμό και περιορισμό μεγάλων ομάδων ψαριών με τη βοήθεια σάκων μέσα στους οποίους προστίθεται η κατάλληλη δόση διαλυμένου αναισθητικού, ενώ ταυτόχρονα γίνεται συνεχώς παροχή οξυγόνου ή αέρα για να αποφευχθεί τυχόν ανοξία, στη συνέχεια υπολογίζεται, με βάση την εκτιμώμενη βιομάζα των ψαριών, η ποσότητα του κατάλληλου εμβολίου (συνήθως για 100 κιλά ψαριών χρειάζεται 1 λίτρο εμβολίου) και διαλύεται σε νερό, σε αναλογία 1 προς 10, μέσα σε κατάλληλο δοχείο στο οποίο γίνεται πάλι παροχή οξυγόνου για να περιοριστεί η καταπόνηση των ψαριών. Στη συνέχεια, τα αναισθητοποιημένα ψάρια μεταφέρονται πίσω στις δεξαμενές τους, όπου υπάρχει κατάλληλη οξυγόνωση (Varvarigos 2003) (Εικ. 2-9).

Η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Εικόνες 8-9) είναι μία μέθοδος για τον εμβολιασμό των ψαριών που εξασφαλίζει την καλύτερη και τη μεγαλύτερη σε διάρκεια προστασία. Ο εμβολιασμός με αυτήν τη μέθοδο έχει το πλεονέκτημα ότι εξασφαλίζει τη χορήγηση της σωστής δόσης εμβολιακού αντιγόνου σε κάθε ψάρι (Ellis 1988, Smith 1988). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί λιγότερη ποσότητα εμβολίου σε σχέση με τις άλλες μεθόδους, ωστόσο είναι κατάλληλη για εφαρμογή μόνο σε ψάρια μεγέθους άνω των 10 γραμμαρίων (Press and Lillehaug 1995). Επίσης, απαιτεί εντατική εργασία, είναι ακριβή και σε συνδυασμό με τα πηκτά ελαιώδη έκδοχα μπορεί να προκαλέσει συμφύσεις αν δεν χορηγηθεί σωστά (Ellis 1997).

Κατά τη διαδικασία του εμβολιασμού με ενδοπεριτοναϊκή ένεση, ομάδες ψαριών διαχωρίζονται και απομονώνονται από τα υπόλοιπα ψάρια του κλωβού, όπως ακριβώς και κατά τη διαδικασία της εμβάπτισης, αλλά λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους, χρειάζεται πολύ μεγάλη φροντίδα κατά τη διάρκεια της χορήγησης των αναισθητικών, καθώς όσο μεγαλύτερο είναι το ψάρι τόσο αυξάνεται ο κίνδυνος τραυματισμών λόγω της καταπόνησης. Μετά την αναισθητοποίηση, μικρές ομάδες ψαριών συλλαμβάνονται και τοποθετούνται σε δεξαμενή που περιέχει διάλυμα αναισθητικού, αλλά σε υψηλότερη δόση, μέχρι να ακινητοποιηθούν τελείως. Τα αναισθητοποιημένα ψάρια μεταφέρονται στη συνέχεια σε ειδικό «τραπέζι εμβο-





**Figures 4-5.** Maintenance of anaesthetized fish in small plastic buckets with holes placed in the main vaccination tanks. After the necessary time the small plastic buckets are drained from the vaccine dilution (Varvarigos P 2003).

**Εικόνες 4-5.** Παραμονή των αναισθητοποιημένων ψαριών, μέσα σε διάτρητες πλαστικές λεκάνες, μέσα σε δεξαμενή που περιέχει το διαλυμένο εμβόλιο. Μετά τον απαραίτητο χρόνο παραμονής σηκώνονται οι λεκάνες και αποστραγγίζεται το διάλυμα του εμβολίου (Varvarigos P 2003).



**Figures 6-7.** The vaccinated fish are transferred carefully back at the rearing tanks (Varvarigos P 2003).

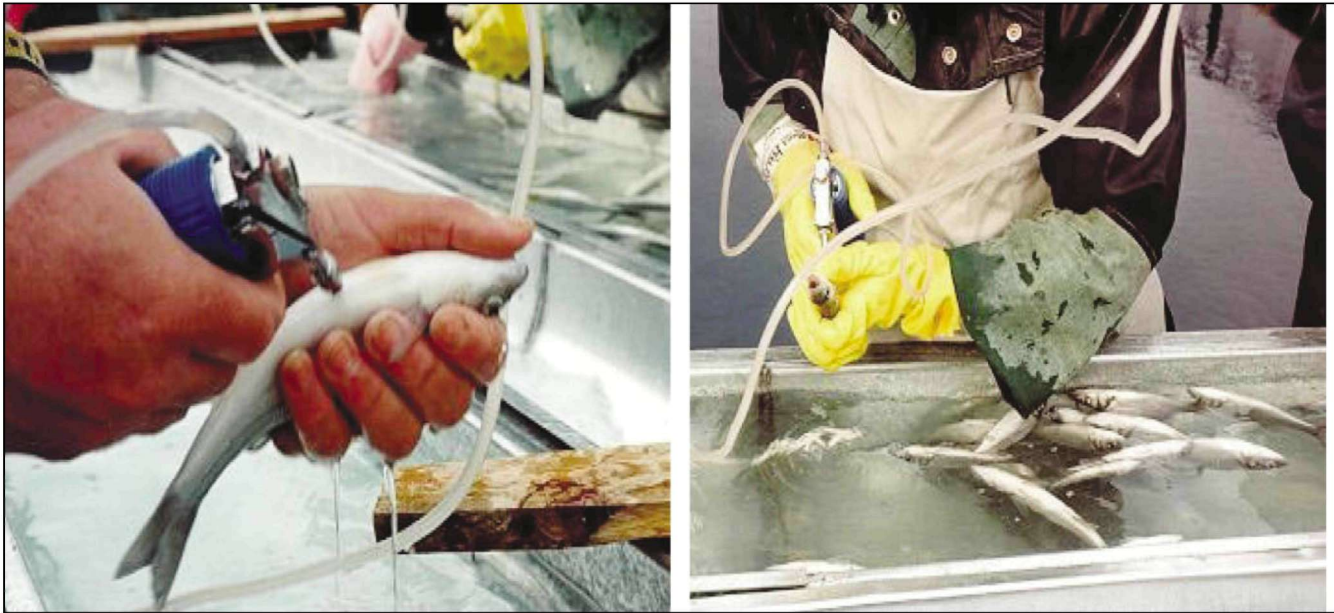
**Εικόνες 6-7.** Τα εμβολιασμένα ψάρια απομακρύνονται από το διάλυμα του εμβολίου και τοποθετούνται προσεκτικά πίσω στις δεξαμενές εκτροφής τους (Varvarigos P 2003).

λιασμού», που αποτελείται από μια ή περισσότερες λεκάνες γεμάτες με νερό όπου τα αναισθητοποιημένα ψάρια χειρίζονται ένα ένα από τα άτομα που κάνουν τον εμβολιασμό. Μια συγκεκριμένη δόση εμβολίου, συνήθως 0,1 με 0,2 ml, εγχέεται στην κοιλιακή περιοχή κάθε ψαριού, το οποίο συγκρατείται με την κοιλιά προς τα πάνω και το κεφάλι αντίθετα προς το σώμα του εμβολιαστή, η είσοδος της βελόνας στην περιτοναϊκή κοιλότητα γίνεται υπό γωνία 45° και σε βάρ-

θος περίπου 0,5 cm και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά αυτόματα πιστόλια εμβολιασμού.

Στη συνέχεια, τα εμβολιασμένα πλέον ψάρια ελευθερώνονται πίσω στις δεξαμενές τους όπου γίνεται ανάληψη από την αναισθησία μέσα σε λίγα λεπτά. Συνήθως το τραπέζι εμβολιασμού είναι κατασκευασμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπει την ταυτόχρονη ταξινόμηση των ψαριών σε ομάδες με βάση το μέγεθός τους και στη συνέχεια την απελευθέρωσή





**Figures 8-9.** Vaccination of fish by intra-peritoneal injection on specific vaccination table where fish are anaesthetized in specific tanks (Varvarigos P 2003).

**Εικόνες 8-9.** Εμβολιασμός ψαριών με τη μέθοδο της ενδοπεριτοναϊκής ένεσης πάνω σε ειδικό τραπέζι εμβολιασμού, όπου τα ψάρια βρίσκονται αναισθητοποιημένα μέσα σε ειδικές σκάφες (Varvarigos P 2003).

τους σε ξεχωριστά κανάλια μέσα στα οποία αντλείται νερό που παρασέρνει τα ψάρια κατά μήκος σωλήνων που τα οδηγούν σε διαφορετικά κελιά (Varvarigos P 2003). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει και η μέθοδος εμβολιασμού με ενδομυϊκή ένεση, αλλά χρησιμοποιείται σπάνια.

### ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Η πρώτη επίδειξη ανάπτυξης προστατευτικής ανοσίας στα ψάρια, και συγκεκριμένα στα σολομοειδή, έγινε από τον Duff το 1942, ο οποίος χρησιμοποίησε το βακτηρίδιο *Aeromonas salmonicida*, το οποίο είχε προηγουμένως αδρανοποιήσει με τη χρήση χλωροφόρμιου, σαν ανοσοποιητικό σε ένα είδος πέστροφας, ενώ το πρώτο εμπορικό εμβόλιο που παρασκευάστηκε για τις υδατοκαλλιέργειες, αδειοδοτήθηκε το 1976 και ήταν για την πρόληψη της εντερικής ερυθροστοματίτιδας (Evelyn 1997).

Σήμερα υπάρχουν πολλές κατηγορίες εμβολίων, τα οποία κατασκευάζονται με διαφορετικό τρόπο έτσι ώστε να είναι σε θέση να προκαλούν, στα εμβολιασμένα ψάρια, προστατευτική ανοσία κατά των παθογόνων παραγόντων.

Τα εμβόλια που αποτελούνται από ολόκληρα αδρανοποιημένα κύτταρα έχουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες εμβολίων

σε ότι αφορά την ασφάλειά τους και την ευκολία παρασκευής τους. Σχεδόν όλα τα διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια είναι αυτού του τύπου. Αυτά τα εμβόλια είναι αποτελεσματικά και προστατεύουν τα ψάρια από διάφορα νοσήματα (Ellis 1997, Stevenson 1997). Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν και αδρανοποιημένα εμβόλια ιών ενάντια στη λοιμώδη νεκρωτική παγκρεατίτιδα του σολομού του Ατλαντικού (Dixon 1997).

Τα εμβόλια υπομονάδων, αντίθετα με τα προηγούμενα, είναι εμβόλια που παρασκευάζονται από ένα τμήμα μόνο του παθογόνου μικροοργανισμού, το οποίο μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας (Winton 1998). Στην πράξη, η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού τέτοιων τμημάτων από ένα μικροοργανισμό απαιτεί εντατική εργασία και έχει πολύ υψηλό κόστος. Τα εμβόλια υπομονάδων βασίζονται συνήθως στην έκφραση όλου ή ενός τμήματος μόνο, ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την παραγωγή ενός προστατευτικού αντιγόνου, μέσα σε ένα ξένο βακτήριο, ιό ή μέσα σε ένα ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης γονιδίων (Lorenzen 1999). Η σχετική ασφάλεια αυτών των εμβολίων είναι πολύ υψηλή, επειδή κατά τη διαδικασία παραγωγής τους δεν υπεισέρχεται κανένας παθογόνος παράγοντας.

Τα ζωντανά ανασυνδυασμένα εμβόλια περικλεί-



ουν μη παθογόνα γένη των παθογόνων για τα ψάρια μικροοργανισμών, που έχουν υποστεί γενετική εξασθένηση, μη παθογόνα βακτήρια, καθώς και φορείς ιών ικανών για τη μεταφορά και την έκφραση ανασυνδυασμένου DNA που κωδικοποιεί την παραγωγή προστατευτικών αντιγόνων των παθογόνων μικροοργανισμών των ψαριών (Lorenzen 1999). Παραδοσιακές μέθοδοι διαδοχικών περασμάτων σε καλλιέργειες (κυτταρικές σειρές) και πρόκλησης μεταλλάξεων έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή εξασθενημένων εμβολίων εναντίον των παθογόνων παραγόντων των ψαριών, ωστόσο η υπολειμματική λοιμογόνος δράση αυτών των εμβολίων και η λοιμογόνος δράση τους σε άγρια είδη ψαριών, αποτελεί συχνά πρόβλημα (Benmansour and de Kinkelin 1997). Γενικά, τα ζωντανά ανασυνδυασμένα εμβόλια θεωρούνται ανώτερα από τα εμβόλια υπομονάδων εξ' αιτίας της δυνατότητας χορήγησης με τη μέθοδο της εμβάπτισης και της ικανότητας αντιγραφής μέσα στο ψάρι, προκαλώντας τη διέγερση μιας πιο έντονης χυμικής και κυτταρικής ανοσίας (Winton 1998).

Τέλος, τα γενετικά εμβόλια στηρίζονται στην έγχυση πλασμιδιακού DNA μέσα στους σκελετικούς μύες των ψαριών, με την οποία κωδικοποιούνται γονίδια των παθογόνων μικροοργανισμών των ψαριών κάτω από τον έλεγχο ευκαρυωτικών καταλυτών (Lorenzen 1999, Winton 1998). Η παραγωγή του αντιγόνου στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή απαιτεί την παραλαβή από τα κύτταρα του ξενιστή και την επί τόπου έκφραση του κωδικοποιημένου, από το πλασμίδιο, γονιδίου (Lorenzen 1999). Αυτή η μέθοδος παραγωγής αντιγονικών πρωτεϊνών επιτρέπει να γίνει η κατάλληλη αναδίπλωση και τροποποίηση, μετά τη μετάφραση, για την εγκατάσταση των αντισωμάτων ακριβώς πάνω σε τοπογραφικά συμπληρωματικούς επίτοπους και στοχεύει στην εγκατάσταση κυτταρικής ανοσίας.

Τα DNA εμβόλια, που παράγονται με την τεχνολογία ανασυνδυασμού του DNA, αντιπροσωπεύουν ένα νέο πεδίο στον τομέα της ανάπτυξης των εμβολίων και έχουν δείξει ότι είναι αποτελεσματικά στο να προκαλέσουν την ανάπτυξη ανοσίας ενάντια σε ασθένειες που οφείλονται σε ιούς, όπως η λοιμώδης νεκρωτική παγκρεατίτιδα (IPN) και η λοιμώδης αιμορραγική σηψαιμία της πέστροφας (VHSV) (Frost and Ness 1997). Τα εμβόλια DNA υπερτερούν των συμβατικών εμβολίων, γιατί η ειδική ανοσολογική ανταπόκριση που αναπτύσσεται μετά τον εμβολιασμό, πε-

ριλαμβάνει αντισώματα, T-βοηθητικά κύτταρα και κυτταροτοξικά κύτταρα (Gudding et al. 1999). Επιπρόσθετα, είναι μη μολυσματικά, σταθερά και σχετικά εύκολα και οικονομικά για παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα πολλά θέματα σχετικά τόσο με την ασφάλεια των ίδιων των ψαριών όσο και με την προστασία του περιβάλλοντος, τα οποία πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν προτού επιτραπεί η χρήση των εμβολίων DNA στις υδατοκαλλιέργειες, σε ευρεία κλίμακα. Είναι βέβαιο πάντως ότι τα επόμενα χρόνια η χρήση των εμβολίων, που παράγονται με ανασυνδυασμό του DNA, στις υδατοκαλλιέργειες, θα εδραιωθεί καθώς οι παραδοσιακές μέθοδοι αντιμετώπισης των παρατηρούμενων νοσημάτων συχνά αποτυγχάνουν.

## ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Οι παρενέργειες των εμβολίων, που παρατηρούνται στα ψάρια, εξαρτώνται κυρίως από τη μέθοδο χορήγησής τους και το είδος του εμβολίου που χρησιμοποιείται. Έτσι, οι σοβαρότερες παρενέργειες παρατηρούνται στις περιπτώσεις που τα εμβόλια χορηγούνται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση και περιέχουν διάφορες επικουρικές ουσίες (έκδοχα), η μέθοδος αυτή ωστόσο αποτελεί ταυτόχρονα και την περισσότερο αποτελεσματική οδό χορήγησης εμβολίων (Midtlyng et al. 1996a, Midtlyng et al. 1996b, Anderson 1997, Evensen 2003). Επιπλέον, ευεργετική είναι και η δράση των επικουρικών ουσιών, όπως για παράδειγμα, η εισαγωγή των ελαιωδών επικουρικών ουσιών που ήταν πολύ αποτελεσματικές στον έλεγχο της δοθεινώσης των σολομοειδών (Midtlyng 1996). Ενώ, όμως, οι ουσίες αυτές είναι τόσο χρήσιμες στην αύξηση της ανοσολογικής ανταπόκρισης, συχνά επικουρικές ουσίες, όπως τα ρυνκτά έλαια, προκαλούν παρενέργειες στα ψάρια, κυρίως στα σολομοειδή, που περιλαμβάνουν μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης, χρόνια περιτοναϊκή κοιλότητα (Εικ. 10-12) (Udey and Fryer 1978, Olivier et al. 1985, Midtlyng et al. 1996a, Midtlyng et al. 1996b, Poppe and Breck 1997, Midtlyng and Lillehaug 1998, Bowden et al. 2003, Mutoloki et al. 2004). Δεδομένου ότι οι παρενέργειες των εμβολίων στα ψάρια μπορούν να έχουν σοβαρό οικονομικό αντίκτυπο στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, η προσπάθεια για παρασκευή ασφαλέστερων εμβολίων, είναι μείζονος σημασίας για την πρόοδο της τεχνολογίας των εμβολίων (Midtlyng 1997, Gudding et al. 1999).





**Figure 10.** Liver adhesions of the abdominal wall and internal organs at the area of injection (Lemia 2003).

**Εικόνα 10.** Συμφύσεις ήπατος, κοιλιακού τοιχώματος και εσωτερικών οργάνων στην περιοχή της ένεσης (Lemia 2003).



**Figure 11.** Adhesions of liver on the abdominal wall (Lemia 2003).

**Εικόνα 11.** Προσκόλληση ήπατος στο κοιλιακό τοίχωμα (Lemia 2003).

## ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΩΝ ΣΤΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Τα κύρια νοσήματα των ψαριών που αποτελούν μείζον πρόβλημα στις υδατοκαλλιέργειες της Ελλάδος (για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα εμβολίων που μπορούν να συμβάλουν στην πρόληψη τους) είναι η δονακίωση, η δοθιήνωση, η εντερική ερυθροστοματίτιδα και η παστεριδίαση (Αθανασοπούλου 2006).

### ΔΟΝΑΚΙΩΣΗ (VIBRIOSIS)

Το γένος *Vibrio* περιλαμβάνει τα περισσότερα σημαντικά υδρόβια, παθογόνα για τα ψάρια, βακτήρια



**Figure 12.** Adhesion of internal organs (Lemia 2003).

**Εικόνα 12.** Συμφύσεις μεταξύ των εσωτερικών οργάνων (Lemia 2003).

και τα είδη *Vibrio* βρίσκονται διάσπαρτα σε όλο το υδάτινο περιβάλλον. Τα *Vibrio* spp είναι gram αρνητικά βακτήρια, κινητά, και ορισμένα είδη, όπως το *V. anguillarum*, το *V. Ordalii*, το *V. Salmonicida*, το *V. harveyi* και το *V. alginolyticus* είναι οι κύριοι παράγοντες που προκαλούν τη δονακίωση, που είναι μια πολύ σοβαρή ψηψαιμική λοίμωξη (Toranzo et al. 1997, Yiagnisis et al. 2008, Yiagnisis et al. 2009). Το *V. anguillarum* είναι το περισσότερο λοιμογόνο είδος *Vibrio* και παράγει ποικιλία από πρωτεάσες υπεύθυνες για την πρόκληση ελκωτικών αλλοιώσεων στους σκελετικούς μύες. Υπάρχουν 10 ορότυποι του *V. anguillarum*, οι ορότυποι 01 και 02 είναι αυτοί που συναντούμε συχνότερα στα μεσογειακά εκτρεφόμενα είδη και στη μόλυνση με αυτούς τους ορότυπους ανα-



φέρεται συνήθως ο όρος δονακίωση (Αθανασοπούλου 2006). Τα είδη *Vibrio* έχουν ισχυρά ανοσοποιητικούς λιποπολυσακχαρίτες, οι οποίοι διεγείρουν την παραγωγή έντονης προστατευτικής ανοσολογικής ανταπόκρισης στα σολομοειδή (Toranzo et al. 1997) και γενικά σε όλα τα ψάρια. Εμπορικά εμβόλια, που βασίζονται σε προπαρασκευη του βακτηρίου των ειδών *Vibrio*, είναι πολύ αποτελεσματικά και προκαλούν μακροχρόνια ανοσία.

### ΔΟΘΙΝΩΣΗ (FURUNCULOSIS)

Η δοθίνωση προκαλείται από το βακτηρίδιο *Aeromonas salmonicida*, που είναι ένα gram αρνητικό, μη κινητό βακτήριο. Είναι πιθανώς το περισσότερο συχνά παρατηρούμενο νόσημα μεταξύ των εκτρεφόμενων σολομοειδών και απαντάται οπουδήποτε εκτρέφονται σολομοειδή. Η *A. salmonicida* παράγει ένα μεγάλο αριθμό, καλά χαρακτηρισμένων, λοιμογόνων παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται ένα υδρόφοβο επιφανειακό πρωτεϊνικό στρώμα (A-layer), μία πολυσακχαριδική κάψα, σερίνη και μέταλλοπρωτεάσες, μια αιμολυτική κυτταροτοξίνη και μια γλυκεροφωσφολιπιδική-χολήστερο-άκυλο τρανφεράση (Ellis 1997). Η *A. salmonicida*, γενικά, δεν είναι τόσο ισχυρά ανοσοποιητική όσο τα διάφορα είδη *Vibrio*, ωστόσο και τα προπαρασκευασμένα βακτήρια της *A. salmonicida* μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας. Η προστασία που παρέχεται από τα προπαρασκευασμένα βακτήρια της *A. salmonicida* είναι καλύτερη, όταν η *A. salmonicida* χορηγείται σαν συστατικό ενός πολυδύναμου εμβολίου, το οποίο περιέχει και άλλα βακτήρια ισχυρότερο ανοσοποιητικά από την ίδια (Evelyn 1997).

### ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΕΡΥΘΡΟΣΤΟΜΑΤΙΤΙΔΑ (ENTERIC REDMOUTH DISEASE)

Η εντερική ερυθροστοματίτιδα είναι νόσημα που προκαλείται από την *Yersinia ruckeri*, ένα gram αρνητικό, κινητό βακτήριο. Χαρακτηρίζεται από αιμορραγική σηψαιμία, ενώ το σύμπτωμα του ερυθρού στόματος δεν εμφανίζεται πάντοτε. Η *Yersinia ruckeri* έχει 8 ορότυπους, που ταξινομούνται με βάση διαφορές ως προς το LPS και O-αντιγόνο. Από αυτούς, οι ορότυποι O:1 και O:2 είναι οι πιο σημαντικοί για την παρασκευη βακτηριακών εμβολίων κατά της εντερικής ερυθροστοματίτιδας και προκαλούν την ανάπτυξη ισχυρής προστατευτικής ανοσίας (Raida and Buchmanna 2007).

### ΠΑΣΤΕΡΙΔΙΑΣΗ- ΦΩΤΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗ (PASTEURELLOSIS)

Η παστεριδίαση είναι νόσημα που προκαλείται από το βακτήριο *Photobacterium damsela subspecies piscicida*, ένα gram αρνητικό και ακίνητο βακτήριο. Η νόσος μπορεί να εμφανιστεί με δύο μορφές, την οξεία και τη χρόνια, στην οποία είναι χαρακτηριστική η δημιουργία λευκωπών οζιδίων (κοκκιώματα) στο σπλήνα και στους νεφρούς. Για την πρόληψη της νόσου εφαρμόζονται εμβόλια τα οποία χορηγούνται με διάφορους τρόπους και έχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα (Bakopoulos et al. 1997, Athanassopoulou 2006). Τα εμβόλια κατά της παστεριδίασης συνήθως παρασκευάζονται από βακτήρια *Photobacterium damsela subspecies piscicida*, αδρανοποιημένα με φορμαλίνη ή άλλες αδρανοποιητικές ουσίες. ■

## REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams A, Thompson KD, Roberts RJ (1997) Fish vaccines. UN. Rome. Food and Agriculture Organization.
- Anderson DP, Merchant B, Bixon OW, Schott CF, Lizzio EF (1983) Flush exposure and injection immunisation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to selected DNP conjugates. Developmental and Comparative Immunology, 7: 261-268.
- Anderson DP (1997) Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (Eds.), Fish Vaccinology. Basel Karger, 90: 257-265.
- Austin B (1984) The future of bacterial fish vaccines. Vaccine, 2: 249-254.
- Azad IS, Shankar KM, Mohan CV, Kalita B (2000) Update and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody. Dis Aquat Organ, 43: 103-108.
- Athanassopoulou F (2006) Νοσήματα εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα. Διδακτικές σημειώσεις για τους φοιτητές του 7ου εξαμήνου. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Bakopoulos V., Adams A., Richards R. H. (1997) Serological relationship of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates (the causative agent of fish pasteurellosis) determined by Western blot analysis using six monoclonal antibodies. Dis Aquat Org, 28: 69-72.
- Benmansour A, De Kinkelin P (1997) Live fish vaccines: history and perspectives. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (eds.), Fish Vaccinology. Dev Biol Stand 90 Basel Switzerland Karger Publishers, 279-289.
- Bowden TJ, Adamson K, MacLachlan P, Pert CC, Bricknell IR (2003) Long-term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish Shellfish Immunol, 14:363-369.



- Croy TR., Amend DF (1977) Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, 12: 317-325.
- Dixon P (1997) Immunisation with Viral Antigens: Viral Disease of Crap and Catfish. In *Fish Vaccinology* (Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (eds)), Developments in Biological Standardization 90 Karger Basel, 221-232.
- Dorson M (1981) Role and characterization of fish antibody. *Develop Biol Standard*, 49: 307-319.
- Dos Santos NM, Taverne-Thiele JJ, Barnes AC, van Muiswinkel WB, Ellis AE, Rombout JH (2001) The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol*, 11(1): 65-74.
- Duff DCB (1942) The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Journal of Immunology*, 44:87.
- Ellis AE (1985) Development of fish vaccines: strategies and future considerations. In: Ellis AE (eds.), *Fish and shellfish Pathology*. Academic Press London, 41-54.
- Ellis AE (1988) *Fish Vaccination*. Academic Press London, 250: 1-46.
- Ellis AE (1989) The immunology of teleosts. In: Roberts W (Ed.), *Fish pathology 2nd edn* Bailliere Tindall London, 135- 152.
- Ellis AE (1997) Immunization with bacterial antigens: furunculosis. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (Eds.), *Developments in Biological Standardization Basel Karger*, 473: 107-116.
- Evelyn TPT (1997) A historical review of fish vaccinology. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (Eds.), *Fish Vaccinology*. Dev Biol Stand Basel. Switzerland Karger Publishers, 1 - 12.
- Evensen O (2003) The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish-effects and adverse effects. In: 3rd International Symposium on Fish Vaccinology. Norway Bergen, 23.
- Fender DC, Amend DF (1978) Hyperosmotic infiltration: factors influencing uptake of bovine serum albumin by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can*, 35:871-874.
- Fletcher TC, White A (1973) Antibody production in the plaice after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1: 417-428.
- Frost P, Ness A (1997) Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to IPNV challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 7: 609-619.
- Gudding R, Lillehaug A, Evensen O (1999) Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunopathol*, 72(1-2): 203-212.
- Horne MT (1997) Technical aspects of the administration of vaccines. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.), *Developments in Biological Standardization Basel Karger*, 79-89.
- Ire T, Watarai S, Iwasaki T, Kodama H (2005) Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunization with bacterial antigen entrapped in liposomes. *Fish Shellfish Immunol*, 18: 235-242.
- Johnson KA, Flyrm JIC, Amend DF (1982) Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersenia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *J Fish Dis*, 5: 207-213.
- Kawai K, Kusuda R, Itami T (1981) Mechanisms of protection in ayu orally vaccinated for vibriosis. *Fish Pathol*, 15: 257-262.
- Le Morvan C, Troutaud D, Deschaux P (1998) Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology*, 201:165-168.
- Lillehaug A, Ramstad A, Baekken K, Reitan LJ (1993) Protective immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated at different water temperatures. *Fish Shellfish Immunol*, 3:143-156.
- Lobb CJ (1987) Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization. *Dev Comp Immunol*, 11(4): 727-738.
- Lobb CJ, Clem LW (1981) The metabolic relationships of immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus and bile. *J Immun*, 127: 1525-1529.
- Lorenzen N (1999) Recombinant vaccines: experimental and applied aspects. *Fish and Shellfish Immunology*, 9: 361-365.
- Lumsden JS, Ostland VE, Byrne PJ, Ferguson HW (1993) Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Dis Aquat Organ*, 16(1): 21-27.
- Maurice S, Nussinovitch A, Jaffe N, Shoseyov O, Gertler A (2004) Oral immunization of *Carassius auratus* with modified recombinant A-layer proteins entrapped in alginate beads. *Vaccine*, 23: 450-459.
- Midtlyng PJ, Reitan LJ, Lillehaug A, Ramstad A (1996a) Protection, immune response and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish Shellfish Immunol*, 6: 599-613.
- Midtlyng PJ, Reitan LJ, Speilberg L (1996b). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol*, 6: 335-350.
- Midtlyng PJ (1996) A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol*, 6: 553-565.
- Midtlyng PJ (1997) Vaccinated fish welfare: protection versus side effects. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, (Eds.), *Fish Vaccinology 90 Basel Karger*, 371-379.
- Midtlyng PJ, Lillehaug A (1998) Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis Aquat Organ*, 32: 91-97.
- Mutuloki S, Alexandersen S, Evensen O (2004) Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 633-644.
- Nakanishi T, Ototake M (1997) Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.), *Developments in Biological Standardization Basel Karger*, 59-68.
- Olivier G, Evelyn TPT, Lallier R (1985) Immunogenicity of vaccines from a virulent and an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*. *J Fish Dis*, 8: 43-55.
- Paterson WD, Desautels D, Weber JM (1981) The immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L, to the causative agent of bacterial kidney disease *Renibacterium salmoninarum*. *J Fish Dis*, 4: 99-111.
- Peleteiro MC, Richards RH (1985) Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *J Fish Dis*, 8: 161-172.
- Poppe TT, Breck O (1997) Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report *Dis Aquat Organ*, 29: 219-226.
- Press CMcL, Lillehaug A (1995) Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. *Br Vet J*, 151: 45-69.
- Raida M.K., Buchmann K. (2007) Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26: 8.



- Sakai DK (1984) Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. *J Fish Dis*, 7: 29-38.
- Smith PD (1988) Vaccination against vibriosis, in Ellis AE (Ed.), *Fish vaccination*. London Academic Press, 57-85.
- Stevenson RMW (1997) Immunization with Bacterial Antigens: Yersiniosis. In *Fish Vaccinology*, (Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.)). *Developments in Biological Standardization* 90 Karger Basel, 117-124.
- Tatner MF, Manning MJ (1983) The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev Comp Immunol*, 7(1): 69-75.
- Tatner MF (1987) The quantitative relationship between vaccine dilution, length of immersion time and antigen uptake, using a radiolabelled *Aeromonas salmonicida* bath in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 62: 173-85.
- Toranzo AE, Santos Y, Barja JL (1997) Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, F. Brown, (Eds.), *Fish Vaccinology*. Dev Biol Stand Basel Switzerland Karger Publishers, 93- 105.
- Udey LR, Fryer JL (1978) Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. *Mar Fisher Rev*, 40: 269-276.
- Warr GW (1997) The adaptive immune system of fish. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.), *Fish Vaccinology*. Dev Biol Stand Basel Switzerland Karger Publishing, 15-21.
- Winton JR (1998) Molecular approaches to fish vaccines. *Journal of Applied Ichthyology*, 14: 153- 158.
- Yiagnisis M., Alexis M., Bitchava K., Govaris A., Athanassopoulou F. (2008) The impact of different levels of oxygen in the aerobic intestinal microflora of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In: 9th Panhellenic Symposium of Oceanography and Fishing, Patra.
- Yiagnisis M., Solomakos N., Alexis M., Bitchava K., Athanassopoulou F. (2009) *Vibrio* species of medical importance, isolated from diseased marine fish in Greece. *Journal in applied Ichthyology*, in press.
- Zapata AG, Torroba M, Varas A, Jimenez AV (1997) Immunity in fish larvae. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, (Eds.), *Developments in Biological Standardization* Basel Karger, 23-32.

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- Cedric Komar, William.J. Enright, Luc Grisez, and Zilong Tan (2004) Reprinted from *AQUA Culture AsiaPacific Magazine*.
- Lemia MO Hamid (2003) Vaccination of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) against atypical furunculosis using different adjuvants. Cited 15/10/2006. Available from World Wide Web: <http://www.nfh.uit.no/dok/IFM/thesis/lemia2003.pdf>
- Olabuena Susana E (2000) *Fish Immune System*. Gayana (Concept.) vol64 no2, 205-215. Cited 16/10/2006. Available from World Wide Web: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071765382000000200010&lng=en&nrm=iso. ISSN 0717-6538](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071765382000000200010&lng=en&nrm=iso. ISSN 0717-6538).
- Varvarigos P (2003) Practical considerations of vaccination strategies. Cited 28/09/2006. Available from World Wide Web: <http://www.vetcare.gr>.