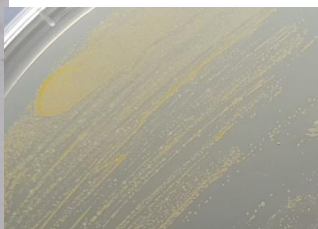


POKUSNA PROIZVODNJA I PRIMJENA AUTOLOGNIH CJEPIVA U UZGOJU LUBINA

Snježana Zrnčić, Ivana Giovanna Zupčić, Lea Vrbančić, Nina Perši,
Jelka Pleadin, Donatella Volpatti, Dražen Oraić

AUTOGENA CJEPIVA PROTIV VIBRIOZE I TENACIBAKULOZE

Autogeno cjepivo – cjepivo pripravljeno od mikroorganizma izdvojenog iz oboljele ribe na određenom uzgajalištu pripravljeno sa ciljem da se primijeni na istom uzgajalištu radi zaštite od infekcije izdvojenim uzročnicima bolesti



- *Vibrio harveyi* je izdvojen iz lubina s tipičnim simptomima bolesti, izolati su serotipizirani, potvrđeni molekularnim metodama i sekvencirani WGS
- Čiste bakterijske kulture su fermentirane u TSB+1.5% NaCl i inaktivirane formaldehidom

- *Tenacibaculum maritimum* izdvojen iz oboljele ribe s tipičnim lezijama na koži, izdvojene bakterije su identificirane, potvrđene molekularnim metodama i sekvencirane WGS
- Čiste bakterijske kulture su fermentirane u Marine bujonu i inaktivirane formaldehidom

Formalinom-inaktivirana puna cjepiva (FMC)

TESTIRANJE SIGURNOSTI I UČINKOVITOSTI CJEPIVA

Sigurnost i netoksičnost cjevica te provjera protokola cjepljenja testirana je na 20 primjeraka za svaki način primjene i tretirana riba je promatrana tijekom 40 dana te nisu zamijećeni mortaliteti

Nakon provjere sigurnosti, netoksičnosti cjevica i učinkovitosti postupka provedeno je pokusno cijepjenje mlađa lubina prosječne tjelesne težine od 10 grama:

Različite skupine su cijepjene ili uranjanjem ili i/p injekcijom, a nakon 35 dana provedena je izazivačka infekcija uranjanjem ili i/p



V. harveyi

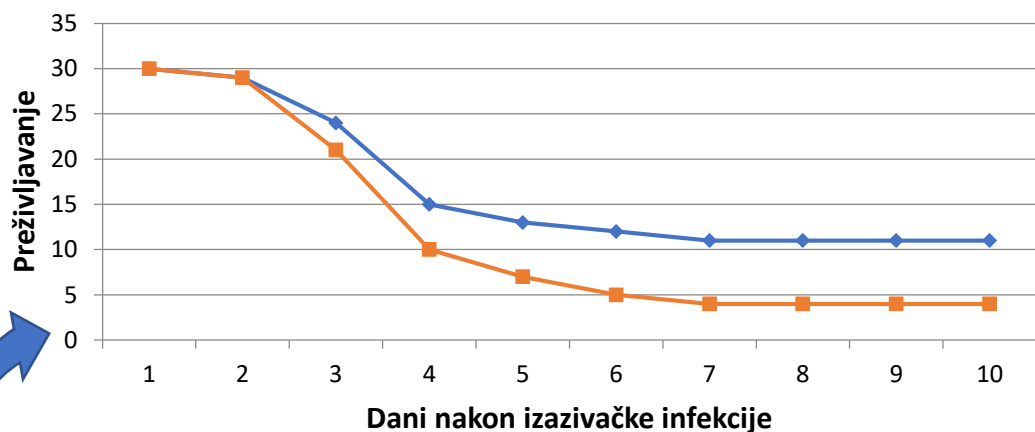


Tenacibaculum maritimum



REZULTATI POKUSNOG CIJEPLJENJA PROTIV *V. HARVEYI*

V. harveyi autogeno cjepivo (uranjanje + i/p)

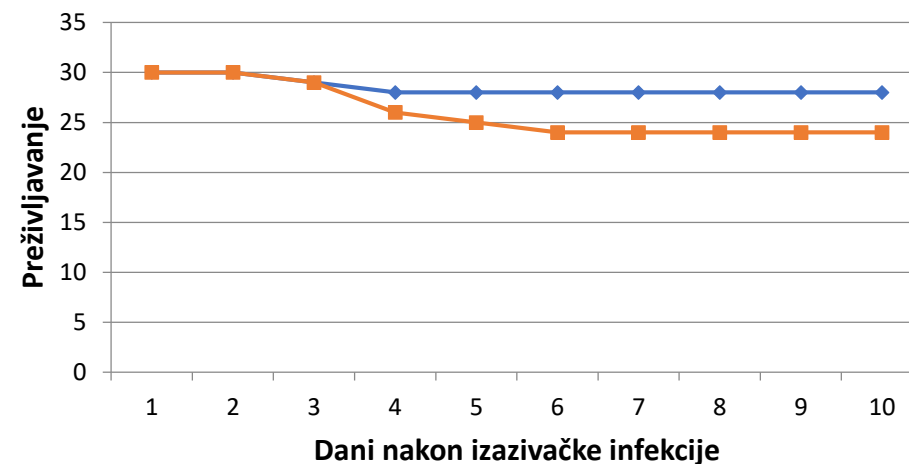


$$RPP = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A - % uginulih riba u cijepljenoj skupini
B - % uginulih riba

◆ Bath vaccination + i/p challenge ■ Non vaccinated + i/p challenge

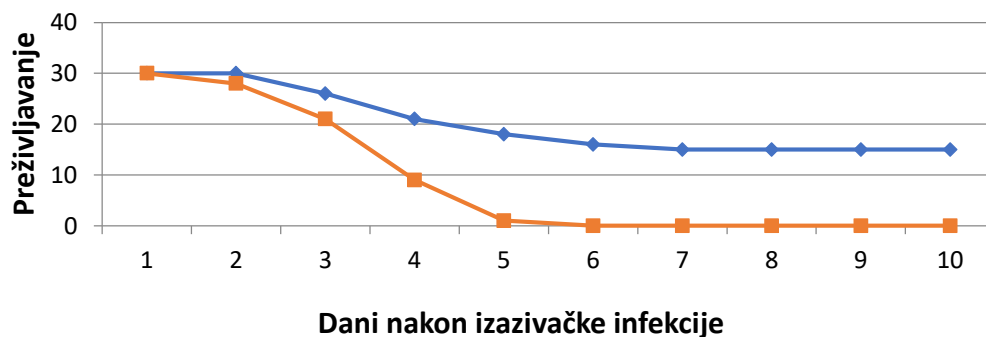
V. harveyi autogeno cjepivo (uranjanje)



◆ Bath vaccination + bath challenge ■ Non vaccinated + bath challenge

Cijepljena = 93,3%
Kontrola = 80%
RPP = 67

V. harveyi autogeno cjepivo (i/p)



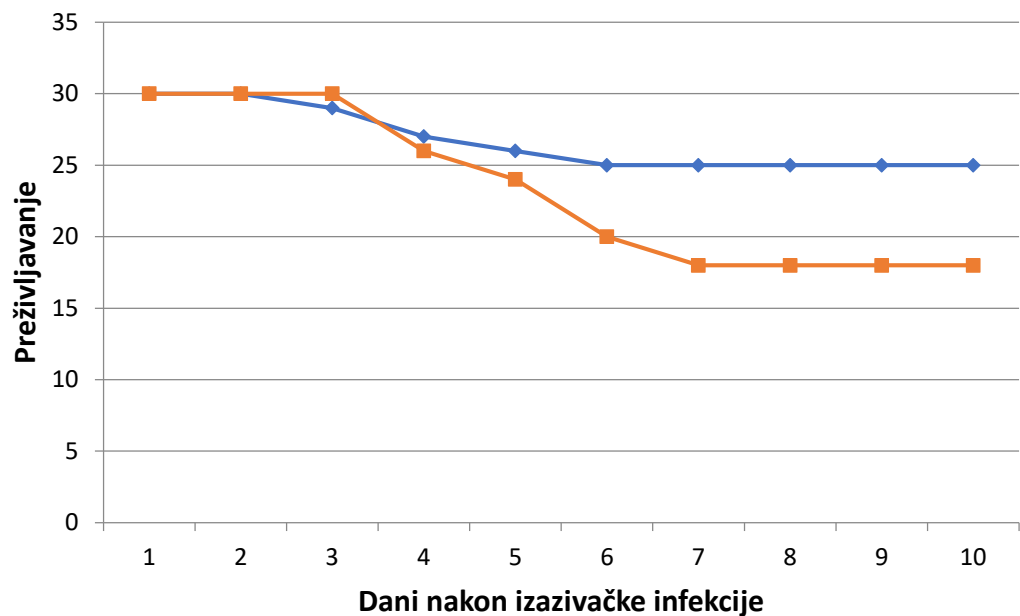
◆ i/p vaccinated + i/p challenge ■ Non vaccinated + i/p challenge

Cijepljena = 50%
Kontrola = 0%
RPP = 100

Cijepljena = 69%
Kontrola = 10%
RPP = 66

REZULTATI POKUSNOG CIJEPLJENJA PROTIV *T. MARITIMUM*

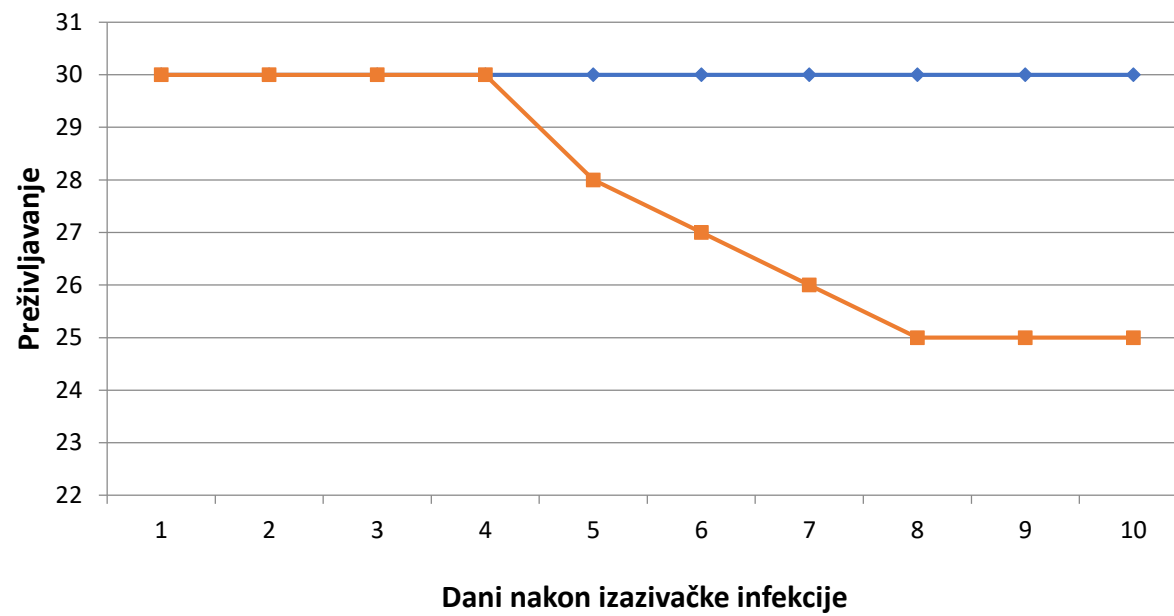
T. maritimum autogeno cjepivo (i/p)



◆ I/p vaccinated + i/p challenged ■ Non vaccinated + i/p challenged

Cijepljena = 87%
Kontrola = 60%
RPP = 67,5

T. maritimum autogeno cjepivo (uranjanje)








◆ Bath vaccinated + bath challenged ■ Non vaccinated + bath challenged

Cijepljena = 100%
Kontrola = 83%
RPP = 100

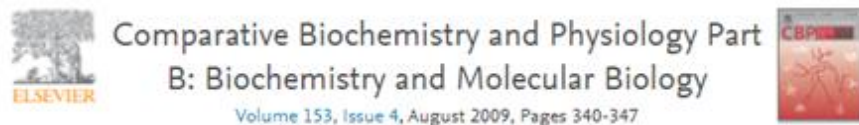
Imunosni odgovor

Ekspresija gena

-  Kako bi ocijenili imunوسي odgovor nakon cijepjenja istraživali smo ekspresiju gena specifičnih za imunوسي odgovor u ciljanim tkivima uzorkovanim od 6 riba iz svake pokusne skupine
-  Organi su uzorkovani 4h, 24h i 10 dana nakon cijepjenja
-  *V. harvey* – Uzorkovani su ciljani organi iz svake pokusne skupine (prednji bubreg, slezena i stražnje crijevo)
-  *T. maritimum* - Uzorkovani su ciljani organi iz svake pokusne skupine (prednji bubreg, slezena i škrge)
-  Svaki je uzorak do pretraživanja pohranjen u RNAlater

Dizajn početnica i probes za ekspresiju gena

- Ciljani geni su odabrani prema dostupnoj znanstvenoj literaturi o imunosnom odgovoru lubina



Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*)

Karin Mitter^a, Georgios Kotoulas^a, Antonios Magoulas^a, Victor Mulero^b, Pilar Sepulcre^b, Antonio Figueras^c, Beatrice Novoa^c, Elena Sarropoulou^a

- Oligonukleotidi su dizajnirani na osnovu homolognosti sa sekvencama dostupnim u bazi nukleotida (NCBI)

Pristupni brojevi za referentne gene :
DT044539 - L13A
FM004681 – Fau

Pristupni brojevi za gene od interesa:
MG596341 – IgT
TDQ821114 - IL10
DQ388037 - p35
AJ311925 - IL1 β

Dizajnirani su u programu
Geneious Prime 2021.1

Design New Primers

Select Task: Design New Design with Existing Design for Sequencing

Primer design uses a modified version of Primer3 2.3.7

Forward Primer DNA Probe Reverse Primer

Task: Generic

Included Region: 40 To 639

Target Region: 40 To 639

Product Size Between: 80 And 150

Optimal Product Size: 1

Number of pairs to generate: 5

Tm Calculation

Characteristics

Primer	DNA Probe
Size Min: 18	Optimal: 20 Max: 27
Tm Min: 60	Optimal: 62 Max: 64
%GC Min: 35	Optimal: 50 Max: 65
Product Tm Min: 0	Optimal: 0 Max: 0
Max Tm Difference: 2	GC Clamp: 0
Max Dimer Tm: 47	Max Poly-X: 3
Max 3' Stability: 9	

Allow primers inside target with penalty: 0

Minimum Primer Distance: 0

Primer Picking Weights

Allow Degeneracy: 1

Advanced

OK Cancel

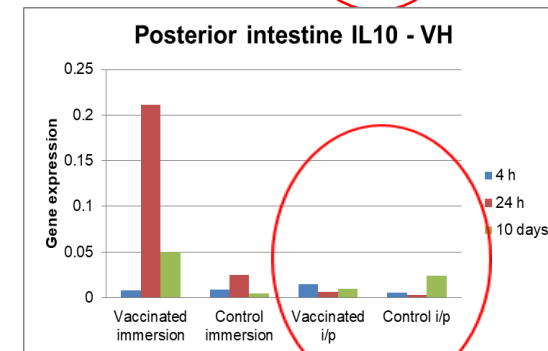
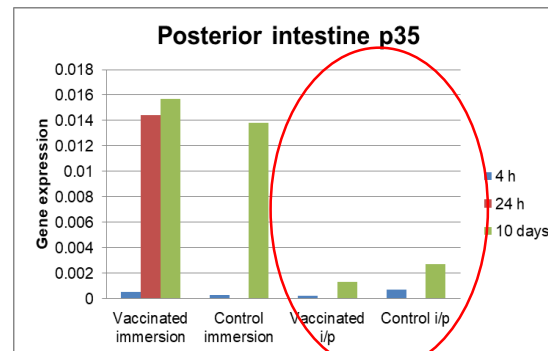
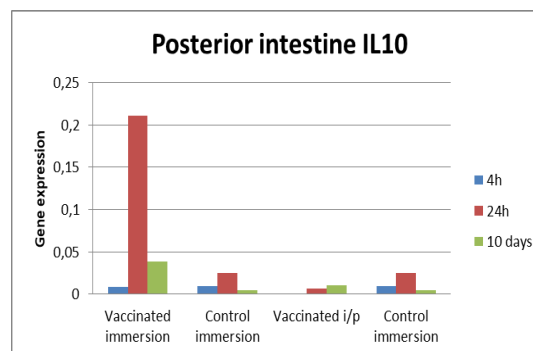
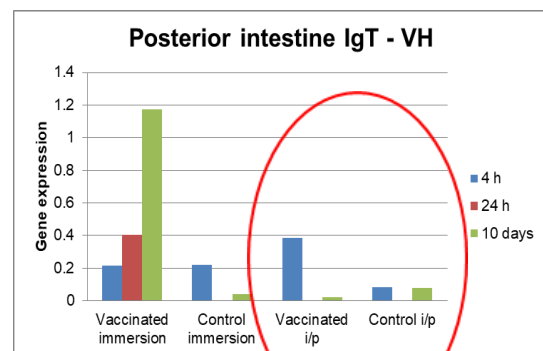
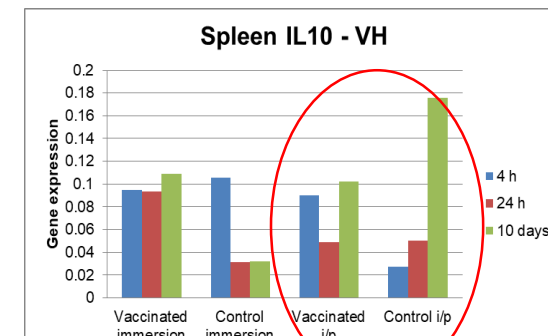
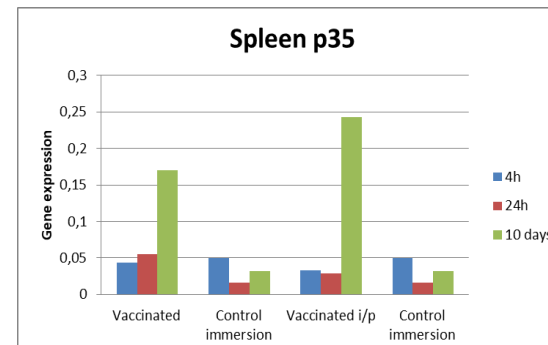
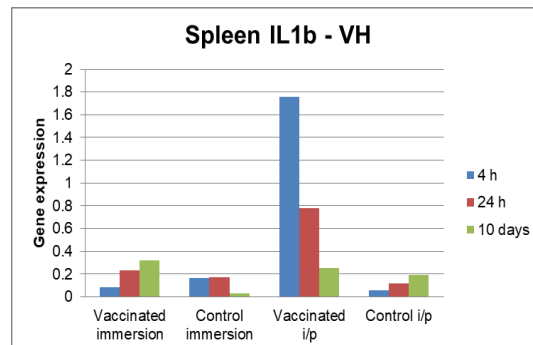
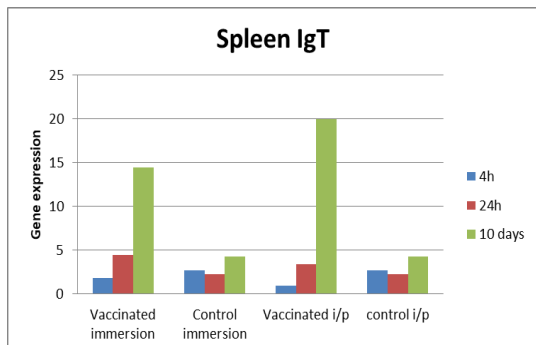
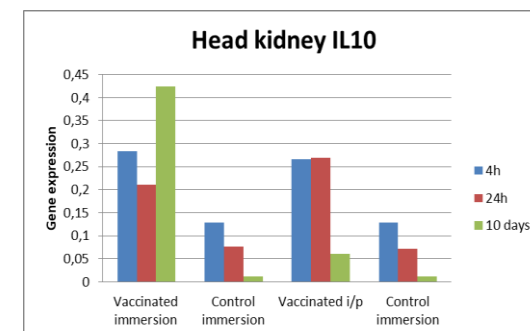
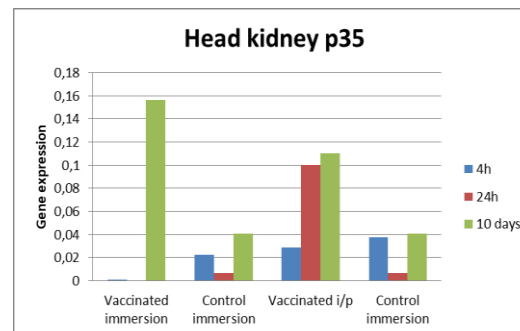
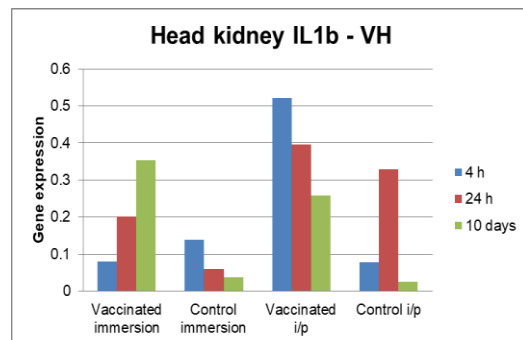
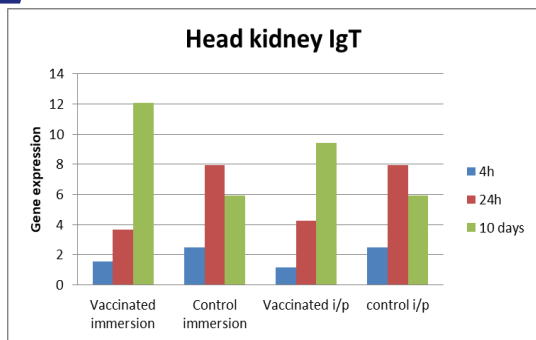
Primer DNA Probe

Size Min: 20	Optimal: 22 Max: 30
Tm Min: 65	Optimal: 67 Max: 70
%GC Min: 35	Optimal: 50 Max: 65
Max Dimer Tm: 44	Max Poly-X: 3

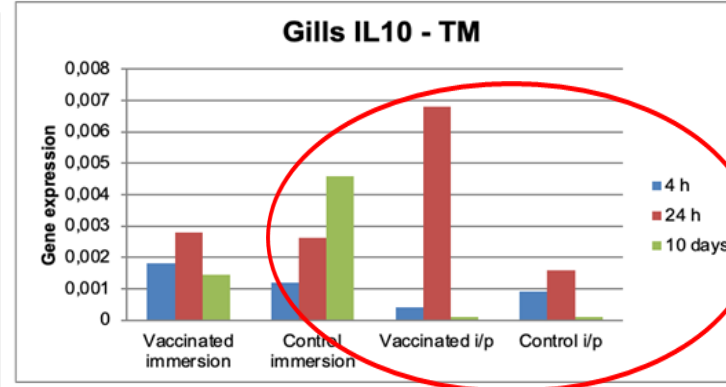
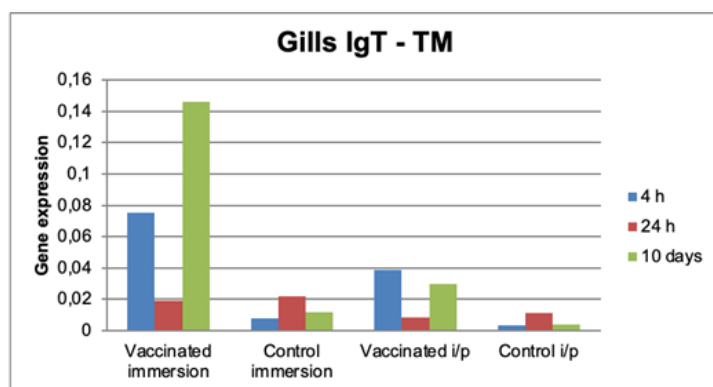
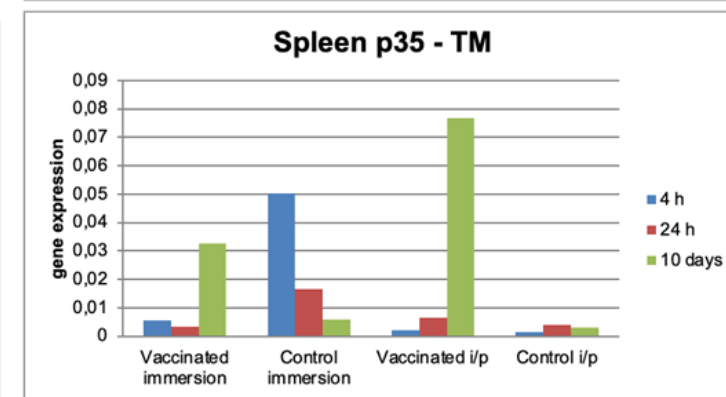
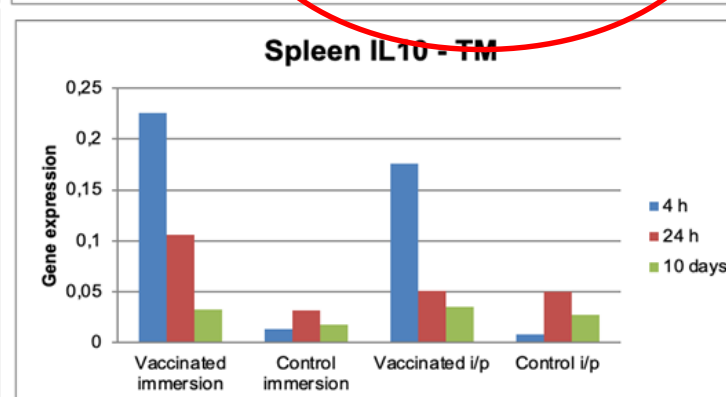
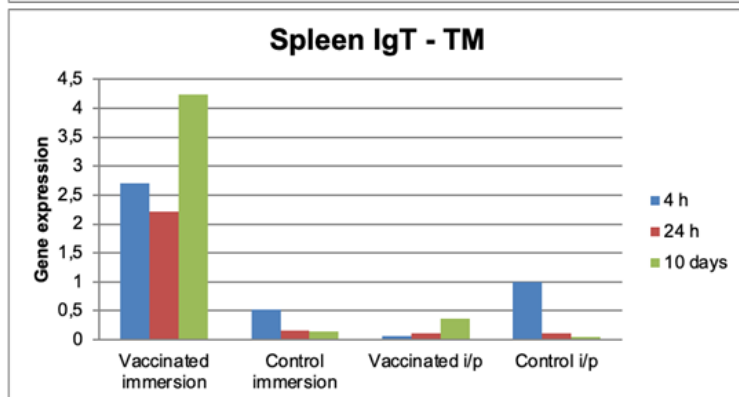
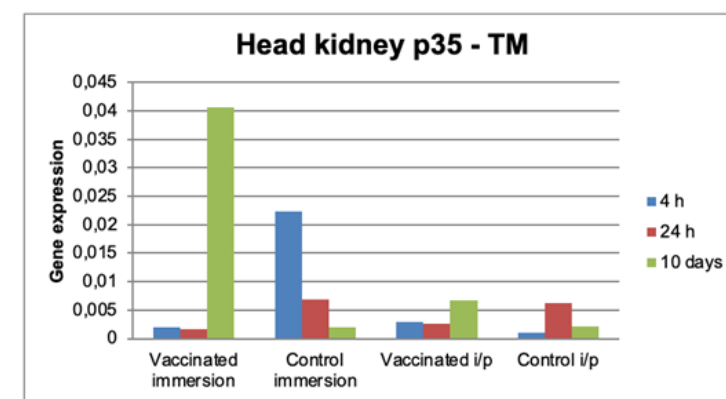
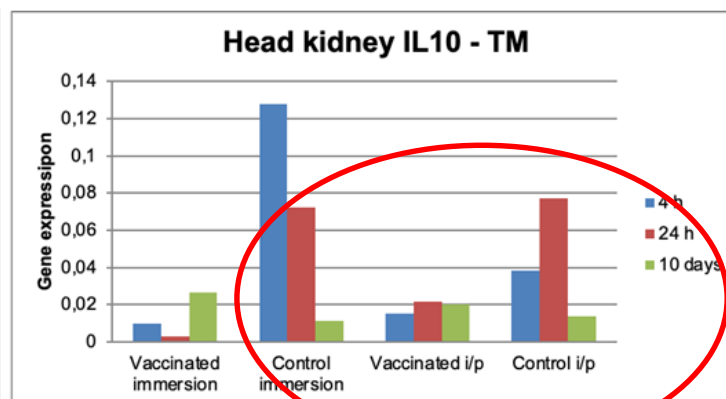
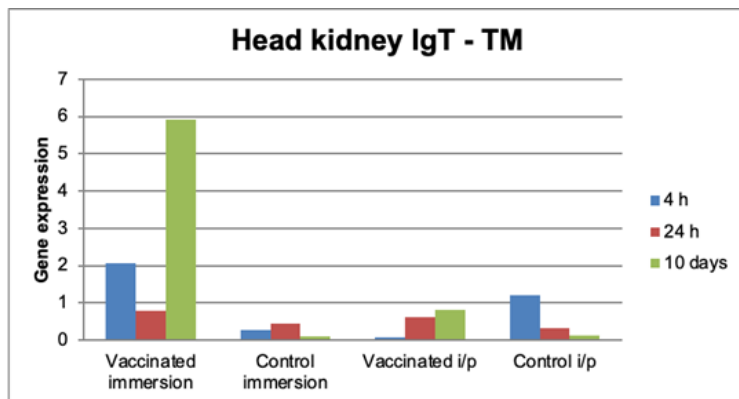
Probe Picking Weights

Allow Degeneracy: 1

V. harvey-rezultati ekspresije gena nakon cijepljenja



T. maritimum-rezultati ekspresije gena nakon cijepljenja



IL1b – rezultate nije moguće objasniti ili nisu dobiveni rezultati

POKUSNO CIJEPLJENJE NA UZGAJALIŠTU

Cijepljenje protiv *V. harveyi*, *T. maritimum* i mješavinom oba cjepiva

Četiri pokusne skupine su smještene u male kaveze (4 x 4 x 4). U svakom je kavezu bilo 1250 riba prosječne težine 13,18 grama. Svaka je skupina cijepljena kako slijedi:

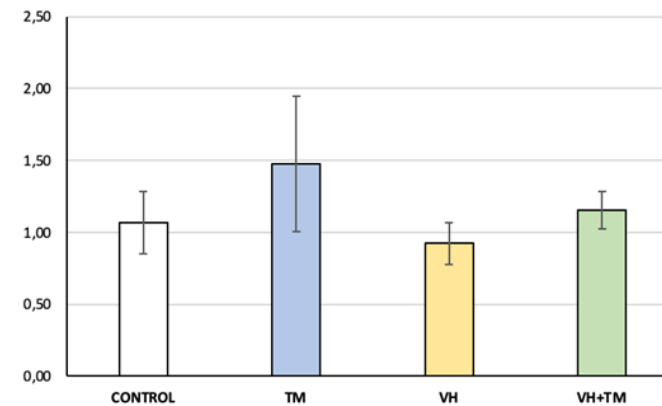
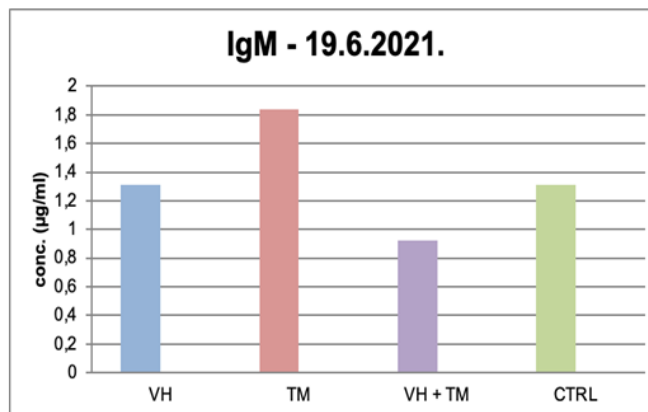
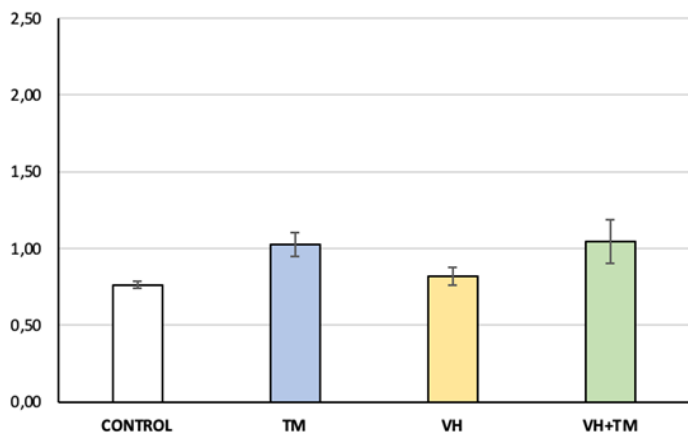
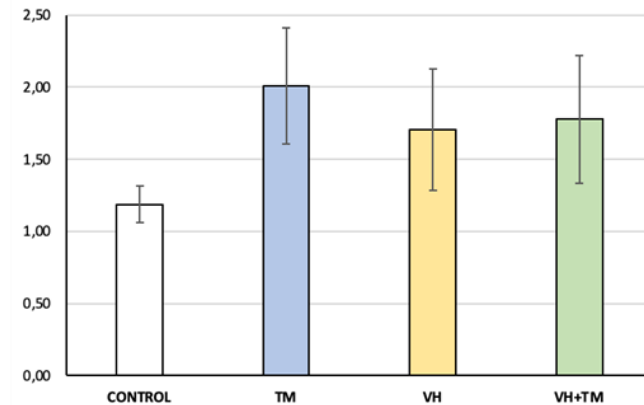
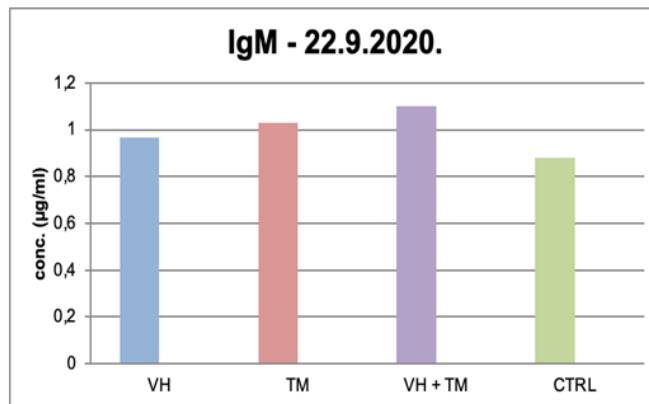
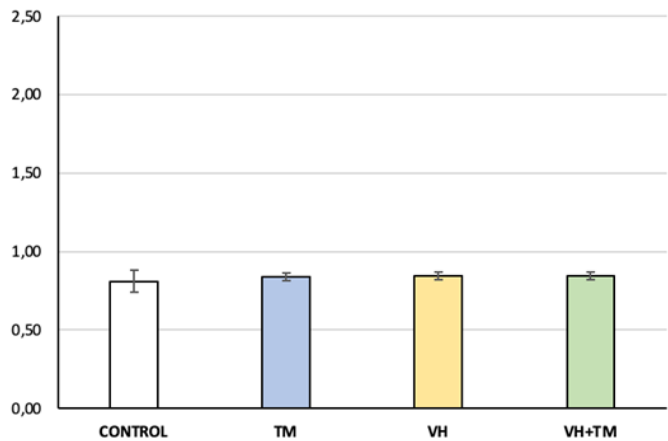
- i) Cijepljenje uranjanjem u cjepivo (3.3×10^8 CFU ml⁻¹) protiv *V. harveyi* u razrjeđenju 1:10 tijekom 1 min
- ii) Cijepljenje uranjanjem u cjepivo (7.4×10^6 CFU ml⁻¹) protiv *T. maritimum* u razrjeđenju 1:10 tijekom 2 min
- iii) Cijepljenje uranjanjem u mješavinu oba cjepiva u razrjeđenju 1:10 tijekom 2 min
- iv) Kontrola, necijepljena skupina



REZULTATI CIJEPLJENJA PROTIV *V. harveyi*, *T. maritimum* I OBA CJEPIVA NA UZGAJALIŠTU

- Udio preživljavanja u svim pokusnim skupinama je bio 98 %
- Tijekom praćenja učinka cijepljene ribe nisu utvrđeni simptomi *V. harveyi* ni *T. maritimum* infekcije niti u jednom od pokusnih skupina uključivši i kontrolnu
- Bakteriološke pretrage pokusnih skupina i riba iz drugih kaveza na uzgajalištu provedene su 10 mjeseci nakon cijepljenja
- Nisu izdvojene ni *V. harveyi* niti *T. maritimum* u pokusnim skupinama
- U ribe iz drugih kaveza na uzgajalištu su izdvojeni i *V. harveyi* i *T. maritimum* u istom razdoblju
- Serum su uzorkovani iz pokusnih skupina dva mjeseca nakon cijepljenja i osam mjeseci nakon cijepljenja
- Indirektna ELISA je provedena kako bi se utvrdili specifični IgM za *V. harveyi* and *T. maritimum*, te su ELISA-om utvrđeni ukupni IgM u serumu primjenom komercijalnog kita za riblje IgM

Indirektna ELISA za specifične IgM VH + ELISA za ukupne IgM – specifične IgM TM





AdriaAquaNet

Jačanje inovacija i
održivosti u
jadranskoj
akvakulturi

Sadržaj:

PREDGOVOR – Snježana Zrnčić i Marco Galeotti	7		
1. UVOD – Snježana Zrnčić i Marco Galeotti	9		
2. IMUNOLOŠKI SUSTAV KOMARČE (<i>SPARUS AURATA</i>) I LUBINA (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>) – Marco Galeotti i Donatella Volpatti	13		
2.1. Uvod	13		
2.2. Organi i stanice imunološkog sustava	14		
2.2.1. Morfologija leukocita	14		
2.3. Glavni mehanizmi nespecifičnog imunološkog odgovora	15		
2.3.1. Komplement	15		
2.3.2. Antimikrobni peptidi i lizozim	15		
2.3.3. Fagocitoza i respiratorni prasak	16		
2.3.4. Citokini	16		
2.4. Glavni mehanizmi odgovora kod specifične imunosti	17		
2.4.1. T i B limfociti - imunoglobulini	17		
2.4.2. Molekule MHC (glavni kompleks histokompatibilnosti) i drugi imunoreceptori	17		
3. GLAVNI BAKTERIJSKI UZROČNICI BOLESTI U JADRANSKOM MORU – Snježana Zrnčić	21		
3.1. Vibrioza uzrokovana bakterijom <i>Vibrio anguillarum</i> – Dražen Oraić	22		
3.1.1. Uzročnik	22		
3.1.2. Infekcija i ekološki faktori	23		
3.1.3. Klinički aspekti bolesti	23		
3.1.4. Kontrola bolesti	24		
3.2. Vibrioza uzrokovana bakterijom <i>Vibrio harveyi</i> – Ivana Giovanna Zupčić	26		
3.2.1. Uzročnik	26		
3.2.2. Infekcija i ekološki faktori	27		
3.2.3. Klinički aspekti bolesti	27		
3.2.4. Kontrola bolesti	28		
3.3. Fotobakterioza uzrokovana bakterijom <i>Photobacterium damselae subsp. piscicida</i> – Marco Galeotti, Chiara Bulfon i Valentina Pacorig	30		
3.3.1. Uzročnik	30		
		3.3.2. Infekcija, patogenezna i okolišni faktori	31
		3.3.3. Klinički aspekti bolesti	31
		3.3.4. Kontrola bolesti	33
		3.4. Tenacibakuloza uzrokovana bakterijom <i>Tenacibaculum maritimum</i> – Snježana Zrnčić i Lea Vrbančić	37
		3.4.1. Uzročnik	37
		3.4.2. Infekcija i ekološki faktori	38
		3.4.3. Klinički aspekti bolesti	38
		3.4.4. Kontrola bolesti	39
		4. CIJEPLJENJE I STRATEGIJA CIJEPLJENJA – Snježana Zrnčić i Dražen Oraić	41
		4.1. Uvod	41
		4.1.1. Vrste cjepiva	41
		4.1.2. Primjena cjepiva	42
		4.2. Popis dostupnih komercijalnih cjepiva	44
		4.3. Cijepljenje u mrijestilištima – Dražen Oraić i Danijel Mejdandžić	46
		4.4. Docijepljivanje na uzgajalištima – Snježana Zrnčić	49
		4.4.1. Docijepljivanje uranjanjem – Snježana Zrnčić i Igor Cvitić	50
		4.4.2. Docijepljivanje injekcijom – Dražen Oraić i Danijel Mejdandžić	54

An aerial photograph of a fish farm in a bay. Several large, rectangular floating cages with green netting are visible in the water. The cages are arranged in a grid-like pattern. In the background, there are large, forested mountains under a clear blue sky. The water is a deep blue color. There are also some smaller, white and red buoys scattered in the water.

HVALA NA POZORNOSTI

ZAHVALJUJEMO: CROMARIS-u na donaciji ribe za pokuse
IOR-u i Friškini, d.o.o. za pomoć u pokusnom
cijepljenju