

Problemy diagnostyki chorób ryb wywołanych przez bakterie *Aeromonas*

ALICJA KOZIŃSKA

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kozłńska A.

Problems concerning the diagnosis of fish diseases caused by *Aeromonas* bacteria

Summary

This report presents the data considered by the author as the most important reasons for difficulties in the diagnosis and control of MAS and MAI caused by motile *Aeromonas* bacteria in fish. The difficulties are chiefly attributed to the properties of these microorganisms, such as their wide variety and variability. Furthermore, numerous studies into certain aspects involved in the pathogenicity of motile *Aeromonas* in fish have been indicated; however, the comparison of the results of these studies is limited or impossible.

The necessity of investigations which may improve diagnostic procedures as well as lead to more applicable, efficient and reasonable methods of the control of MAS and MAI has been stressed.

Keywords: *Aeromonas* sp., infections, fish, diagnosis.

Choroby wywołane przez bakterie rodzaju *Aeromonas*, należą do najbardziej rozpowszechnionych i najczęściej występujących u ryb różnych gatunków, zarówno zimno, jak i ciepłolubnych (4-6, 9, 18, 27, 35, 37, 42, 52, 54). Szczepy należące do grupy ruchliwych *Aeromonas* wywołują choroby, które były wcześniej nazywane, m.in. krwotoczną posocznicą lub *erythrodermatitis*. Obecnie używa się coraz częściej opisowych nazw, w których wyeksponowany jest czynnik etiologiczny: MAS (motile aeromonads septicemia) (27, 49) lub MAI (motile aeromonads infection) (44). Pomimo wieloletnich badań, diagnostyka tych chorób ogranicza się do izolacji i identyfikacji biochemicznej tych zarazków. W profilaktyce i zwalczaniu stosowane są wyłącznie chemioterapeutyki, które nie zawsze są skuteczne i pomimo leczenia, dochodzi do nawrotów choroby. Dlatego też badania dotyczące tych zagadnień nie tracą na aktualności.

Celem opracowania było omówienie i wyjaśnienie przyczyn utrudniających zarówno doskonalenie diagnostyki MAS i MAI, a w konsekwencji ich zwalczania i profilaktyki. Problemy wynikają przede wszystkim z właściwości tych bakterii. Z drugiej strony, liczne badania dotyczące ruchliwych *Aeromonas* sp. są mało uporządkowane i często nieporównywalne. W niniejszym opracowaniu omówiono, zdaniem autora, najważniejsze z nich.

Zjadliwość szczepów z grupy ruchliwych *Aeromonas* a ich przynależność gatunkowa

W wielu wcześniejszych opracowaniach bakterie z grupy ruchliwych *Aeromonas* opisywano jako czynniki słabo patogenne lub też wtórnie wnikające choroby

o innej etiologii (16, 20, 40). Dotyczyło to głównie infekcji występujących u ryb dziko żyjących w warunkach naturalnych. Jednak w warunkach hodowlanych, bakterie te, podobnie jak wiele innych czynników chorobotwórczych, mają o wiele bardziej wzmoczoną siłę działania w stosunku do ryb. Główna różnica polega nie na innej zdolności patogennej czynnika chorobowego, ale na innej reakcji organizmu w warunkach naturalnych i hodowlanych (47). Warunki hodowlane wymagają dużego zagęszczenia ryb i ingerencji człowieka, co powoduje stres i obniżenie odporności naturalnej na infekcje. Jednak pomimo znacznie zwiększonej podatności ryb na infekcje w warunkach hodowlanych, nie wszystkie występujące w środowisku (lub w treści przewodów pokarmowych ryb) szczepy ruchliwych *Aeromonas* są zdolne do wywołania choroby. Obecnie powszechnie wiadomo, że w obrębie tej grupy drobnoustrojów występują szczepy saprofityczne i chorobotwórcze dla różnych gatunków ryb, m.in. dla karpia (5, 52), pstrągów (32, 33, 35, 42), sumików (9, 10, 18, 56), złotych rybek (23) węgorzy (12), tilapii i błękitnego guarami (38). Badania eksperymentalne wykazały, że w obrębie ruchliwych *Aeromonas* występują izolaty niezdolne do wywołania choroby, nawet u ryb (karpia) osłabionych działaniem niekorzystnych warunków środowiskowych, jak również izolaty silnie zjadliwe, wywołujące chorobę w warunkach optymalnych dla tego gatunku ryb (30). Identyfikacja izolatów pozyskanych od ryb z podejrzeniem MAS lub MAI, jako ruchliwe *Aeromonas* sp. nie może zatem być podstawą diagnostyki tych chorób. Izolaty te mogą bowiem należeć do powszechnie występujących w środowisku i u ryb saprofitów, nie posiadających właściwości chorobotwórczych.

Najbardziej znana dotychczas klasyfikacja taksonomiczna ruchliwych *Aeromonas* wg Popoff (45), jest również mało przydatna w identyfikacji izolatów patogennych dla ryb. Według tej klasyfikacji ruchliwe *Aeromonas* obejmują trzy gatunki: *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria*. W obrębie wszystkich trzech gatunków występują szczepy niezjadliwe, jak też o różnym stopniu zjadliwości dla ryb (30, 49, 50, 57). W ostatnich latach klasyfikacja taksonomiczna bakterii *Aeromonas* została w znacznym stopniu udoskonalona, dzięki wykorzystaniu technik biologii molekularnej. Według kryteriów opartych na stopniu pokrewieństwa DNA pomiędzy szczepami, obecnie wyróżnia się co najmniej 12 gatunków tych bakterii: *A. hydrophila*, *A. bestiarum* (wg Popoff klasyfikowane jako *A. hydrophila*); *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila* (wg Popoff klasyfikowane jako *A. caviae*); *A. sobria*, *A. veronii* biotyp *sobria*, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. allosaccharophila* (wg Popoff klasyfikowane jako *A. sobria*) oraz *A. veronii* biotyp *veronii*, *A. schubertii* i *A. encheleia* (1, 3, 7, 8, 14, 15, 21, 22, 26, 51). Dotychczas jednak niewiele jest informacji na temat właściwości patogennych nowo wyodrębnionych gatunków ruchliwych *Aeromonas* dla ryb. Tylko nieliczne dane wskazują, że *A. hydrophila* i *A. jandaei* odgrywają dużą rolę jako pierwotne czynniki etiologiczne posocznicy u węgorzy (12, 13). Większość szczepów izolowanych od chorych ryb *Channa striata* i *Clarias sp.* klasyfikowano jako *A. hydrophila* (58). Są to jednak tylko wyinkowane informacje, dotyczące wybranych gatunków ryb i tylko niektórych gatunków bakterii *Aeromonas*.

Zróznicowanie antygenowe szczepów

Bakterie należące do grupy ruchliwych *Aeromonas sp.* są bardzo zróznicowane antygenowo. Podejmowane liczne próby określenia typów serologicznych w tej grupie drobnoustrojów, mających znaczenie w patologii ryb i człowieka, wskazują na szczególnie dużą różnorodność antygenów somatycznych O i rzęskowych H. W tej grupie bakterii możliwe jest wyróżnienie 12 antygenów O i 9 antygenów H (11, 17, 36, 38). Najnowsze badania wskazują na znacznie większą liczbę antygenów somatycznych O, nawet w obrębie wyselekcjonowanej grupy zjadliwych dla ryb szczepów *Aeromonas sp.* (37, badania własne nieopublikowane). Nie jest dotychczas wyjaśniona zależność pomiędzy przynależnością gatunkową szczepów a ich pokrewieństwem serologicznym (48, 49). Wobec dużego zróznicowania antygenowego chorobotwórczych dla ryb szczepów z grupy ruchliwych *Aeromonas*, nie jest możliwe zastosowanie metod serologicznych w diagnostyce chorób wywoływanych przez te zarazki. Uzyskanie przeciwciał przeciwko jednemu lub nawet kilku szczepom zjadliwym, nie gwarantuje bowiem rozpoznania wszystkich przypadków zachorowań. Różnorodność antygenowa jest także dużym utrudnieniem w opracowaniu szczepionek profilaktycznych przeciwko MAS i MAI (cyt. 27).

Metody oznaczania zjadliwości szczepów

Jednym z najważniejszych elementów w diagnostyce i zwalczaniu chorób zakaźnych jest ustalenie, czy izolowane zarazki są chorobotwórcze i ewentualne określenie stopnia ich zjadliwości. Jak wspomniano, wśród ruchliwych bakterii *Aeromonas* istnieje duże zróżnicowanie w tym zakresie. Jednak badania stopnia zjadliwości budzą wiele kontrowersji. Wynika to głównie ze znacznej dowolności w doborze metod i interpretacji wyników.

Metody bezpośrednie – próby biologiczne. Stopień zjadliwości ruchliwych *Aeromonas* dla ryb określany był przez poszczególne zespoły badawcze różnymi metodami. Najczęściej miarą zjadliwości była wartość LD_{50} przy zakażeniach domięśniowych lub dootrzewnowych (9, 18, 35, 37, 42, 50, 56). W innych badaniach zjadliwość tych bakterii oceniano na podstawie śmiertelności zakażanych ryb, z uwzględnieniem czasu, w którym występowały śnięcia (10, 23). Krovacek i wsp. (32) określali zjadliwość szczepów *Aeromonas hydrophila* na podstawie tempa występowania śnięć ryb po iniekcji domięśniowej różnej liczby bakterii. Według tych badaczy szczepy, które powodowały 100% śnięć, bez wystąpienia jakichkolwiek zmian chorobowych są bardziej patogenne od tych, które powodowały głębokie martwicze uszkodzenia tkanki skórnej i mięśniowej. W innych badaniach wykazano, że poszczególne szczepy mogą się różnie zachowywać w zależności od sposobu zakażenia; np. karpie są bardziej wrażliwe przy zakażeniu podskórnym niż dootrzewnowym (30). Najczęściej charakterystycznymi objawami infekcji wywoływanych przez ruchliwe *Aeromonas* u karpi i innych gatunków ryb, są zmiany w powłokach zewnętrznych i mięśniach (ryc. 1) przy niewielkich, ale długotrwałych śnięciach (20, 25, 27, 41, 52, 54). Rzadziej spotykane są objawy uogólnionej bakteriemii (ryc. 2). Dlatego też wydaje się, że lepszym kryterium oceny zjadliwości tych zarazków jest określenie intensywności zmian chorobowych i określenie wartości ID_{50} niż LD_{50} (30). Ponadto brak jest ujednoczonych norm, zarówno wartości LD_{50} jak też ID_{50} , określających szczepy jako silnie zjadliwe, słabo zjadliwe lub niezjadliwe. Dla ogólnej orientacji można nadmienić, że według różnych autorów, LD_{50} izolatów silnie zjadliwych (np. dla pstrąga tęczowego) wynosi 10^4 - 10^6 , słabo zjadliwych $10^{5.5}$ - 10^7 , natomiast niezjadliwych powyżej 10^7 lub 10^8 . Wartości ID_{50} wynoszą odpowiednio: 1×10^5 - $4,5 \times 10^5$ (izolaty silnie zjadliwe), 6×10^6 - $1,2 \times 10^7$ (słabo zjadliwe) i powyżej 10^8 (niezjadliwe) (30).

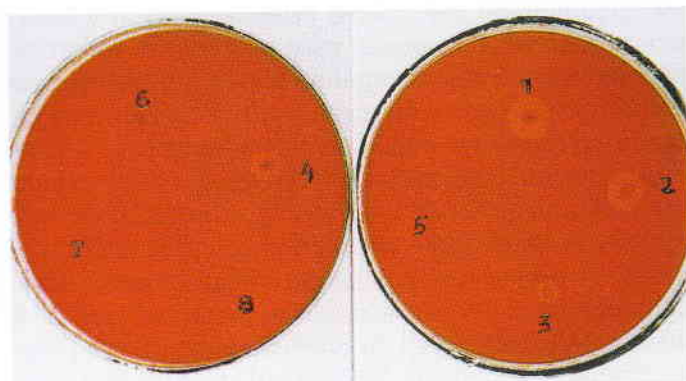
Ważnym czynnikiem przy oznaczaniu zjadliwości drobnoustrojów dla ryb są warunki środowiskowe, a zwłaszcza temperatura wody. W optymalnych warunkach termicznych dla danego gatunku, ryby są znacznie bardziej odporne na zakażenie niż przy temperaturach niesprzyjających. Wykazano, że temperatura nie wpływa na patogenność ruchliwych *Aeromonas* (30, 52), niemniej jednak przy oznaczaniu zjadliwości tych



Ryc. 1. Zmiany chorobowe w skórze i mięśniach karpia, wywołane infekcją bakterii z grupy ruchliwych *Aeromonas*



Ryc. 2. Ogólnoustrojowa infekcja bakteriami z grupy ruchliwych *Aeromonas* u karpia



Ryc. 3. 48-godzinna hodowla różnych szczepów *Aeromonas* sp. na agarze z krwią końską: 1 i 2 – szczepy zjadliwe dla karpia, wykazujące silną aktywność hemolityczną; 3 i 4 – szczepy słabo zjadliwe dla karpia, wykazujące silną lub słabą aktywność hemolityczną; 5-8 szczepy niezjadliwe, nieaktywne hemolitycznie

zarazków ma ona bardzo duże znaczenie. U karpia, będących przedstawicielami ryb ciepłolubnych, w temperaturze 23°C występuje znacznie niższa zachorowalność niż w temp. 17°C i 12°C, pomimo, że zmiany u chorych ryb w różnych temperaturach są porównywalne (5, 30). Przy zakażeniu karpia w różnych porach roku (co jest ściśle związane z temperaturą), zachorowalność była znacznie wyższa w okresie wiosennym (60-100%) niż latem i wczesną jesienią (5-20%) (30). Większość izolatów o słabszej zjadliwości wywołuje natomiast zmiany chorobowe u karpia tylko w temperaturach niższych. Lallier i wsp. (35) wykazali natomiast, że wrażliwość pstrąga tęczowego (ryby zimnolubne) na zakażenie *A. hydrophila* jest znacznie wyższa w temperaturze 18-20°C niż w temperaturze 10°C.

Dane piśmiennictwa dowodzą, że w niektórych badaniach czynnik termiczny jest traktowany z pewną dowolnością (18, 30, 37, 50). W niektórych pracach brak jest w ogóle danych dotyczących warunków termicznych (10, 23). W tej sytuacji, wyniki uzyskane przez poszczególne zespoły badawcze nie mogą być w pełni porównywalne.

Nasuwa się także inna ważna kwestia dotycząca badań nad chorobotwórczością szczepów *Aeromonas* sp. wykazujących ruch. Poszczególne badania prowadzone były na jednym, określonym gatunku ryb. Nie wiadomo jest zatem, czy szczepy chorobotwórcze dla jednego gatunku, wykazują podobne właściwości wobec innych gatunków ryb. Mogą one odznaczać się pewną specyfiką w stosunku do określonego gatunku ryb. Z drugiej strony, wrażliwość ryb na zakażenie określonym szczepem *Aeromonas* może być związana, między innymi z właściwościami śluzu u danego gatunku ryb. Badania Larsen i wsp. (cyt. 31) wskazują, że śluz pokrywający ciało ryb ma właściwości specyficzne dla danego gatunku żywiciela.

Oznaczanie pośrednich wskaźników patogenności. W licznych badaniach, dotyczących określenia czynników warunkujących patogenność ruchliwych *Aeromonas* dla ryb, brano pod uwagę różne właściwości tych zarazków. Szczególnie dużo uwagi poświęcono egzotoksynom i egzoenzymom, takim jak hemolizyny, proteazy, cytotoksyny, leukocydyny. W przeglądzie piśmiennictwa istnieje wiele sprzecznych opinii dotyczących roli tych produktów w patogenezie ruchliwych *Aeromonas*. Szczególnie niejasne jest, czy patogenność tych bakterii jest związana z wytwarzaniem hemolizyn, czy też różnych typów proteaz (2, 9, 24, 28, 32, 37, 43, 50, 55, 56, 59). Rozbieżne opinie wynikają z wielu przyczyn. Przede wszystkim może to być związane z różną wrażliwością określonych gatunków ryb na poszczególne szczepy bakteryjne (o czym wspomniano wyżej). Ponadto może to wynikać z faktu dużego zróżnicowania szczepów w zakresie rodzaju i ilości produkowanych enzymów i toksyn. Produkcja określonych enzymów zależy może nawet od strefy klimatycznej, z której pochodzą izolaty, jak też źródła izolacji (39). Zjadliwość danego szczepu zależy zarówno od ilości jak i rodzaju wydzielanych substancji (29, 53, 56).

W badaniach dotyczących roli hemolizyn w patogenezie ruchliwych *Aeromonas* używane są różne rodzaje krwinek zarówno erytrocyty ryb jak i zwierząt stałocieplnych. Niektórzy autorzy uważają, że produkcja hemolizyn nie koreluje z patogennością bakterii *Aeromonas* sp. dla ryb, wyrażając taką opinię na podstawie aktywności hemolitycznej wobec krwinek rybich (tilapia) (34). Tymczasem w innych badaniach wykazano istotną zależność pomiędzy patogennością izolatów a hemolizą krwinek ludzkich oraz końskich i króliczych, zarówno w aspekcie jakościowym jak i ilościowym (ryc. 3). Natomiast w stosunku do krwinek rybich różnice pomiędzy izolatami patogennymi i niepatogennymi były znacznie mniej wyraźne (34, 50).

Według niektórych badaczy, głównym czynnikiem patogenności bakterii *Aeromonas sp.* są proteazy (28, 55, 56). Zdolność wytwarzania proteaz, takich jak żelatynaza, kazeinaza, albuminaza i fibrylizyna jest cechą stałą dla znacznej większości ruchliwych *Aeromonas*, niezależnie od ich właściwości chorobotwórczych (11, 23, 46, 53). Wydaje się jednak bardzo prawdopodobne, że zjadliwość szczepów zależy w szczególności od ilości wytwarzanych proteaz (24, 30).

Sprzeczne opinie dotyczą także innych właściwości jako ewentualnych pośrednich wskaźników patogenności. Chodzi tu szczególnie o właściwości związane ze strukturą powierzchni komórek, np. odporność na normalną surowicę, zdolność do autoaglutynacji, aglutynacji w obecności akryflawiny, precypitacji po gotowaniu, zdolności adhezyjnych i obecności fimbrii (10, 30, 37, 39, 42, 50).

Wszystkie te kontrowersje wynikają najprawdopodobniej z braku jednolitych metod badawczych i doboru substratów, braku kompleksowych badań, obejmujących równocześnie szeroki zakres właściwości szczepów oraz z ograniczonej (w niektórych pracach nawet do 2) liczby badanych szczepów. Wyniki poszczególnych badań są więc mało porównywalne i utrudniają identyfikację szczepów zjadliwych, pochodzących z różnych źródeł.

Dobór metody, np. przy oznaczaniu produkcji hemolizyn, może mieć duży wpływ na wynik reakcji. Przy użyciu agaru z krwią wszystkie badane izolaty wykazywały wyższą aktywność hemolityczną wobec krwinek rybich niż końskich i króliczych. Natomiast do bulionu tryptozowo-sojowego uwalniane były tylko niewielkie ilości hemolizyn krwinek rybich, w porównaniu z ilością hemolizyn krwinek zwierząt stałocieplnych (30).

O patogenności szczepu nie decyduje jedna cecha lecz zespół właściwości, które mogą występować w różnych kombinacjach u poszczególnych izolatów (10, 30). Dlatego też wnioski, dotyczące określonej, jednej cechy izolatu (bez uwzględnienia innych właściwości) jako wskaźnika patogenności, mogą wydawać się mało precyzyjne.

Wobec dużej różnorodności szczepów ruchliwych *Aeromonas* i ich dużej zdolności przystosowawczej do różnych warunków, bardziej miarodajne są wyniki badań przeprowadzone na odpowiednio dużej liczbie szczepów.

Podsumowanie

Dotychczasowa wiedza nie pozwala na określenie związku pomiędzy zjadliwością ruchliwych *Aeromonas* dla ryb a ich przynależnością gatunkową, według najnowszej klasyfikacji taksonomicznej (14, 15, 26). Niezbędne są więc badania w tym kierunku, które mogą w znacznym stopniu ułatwić diagnostykę szczepów zjadliwych. Ze względu na różnorodność antygenową szczepów chorobotwórczych, metody serologiczne mają ograniczoną wartość diagnostyczną. Niemniej

jednak, jak wykazały ostatnio badania autora (dane nieopublikowane), testy precypitacji żelowej mogą być w dużym stopniu przydatne w diagnostyce patogennych szczepów *Aeromonas sp.*, występujących w określonych obiektach rybackich.

Identyfikacja szczepów zjadliwych metodą prób biologicznych lub na podstawie pośrednich wskaźników patogenności wymaga ujednoczenia metod badawczych oraz określenia jednolitych norm zjadliwości szczepów. Wydaje się, że najbardziej odpowiednim kryterium chorobotwórczości szczepów *Aeromonas* byłoby określenie intensywności zmian chorobowych i ewentualnych śnięć (w następstwie tych zmian), po zakażeniu podskórnym lub domięśniowym ryb, średnią dawką bakterii np. w liczbie 10^7 . Stopień zjadliwości szczepów powinien być określany w temperaturach niekorzystnych dla danego gatunku ryb; u ryb ciepłolubnych w temperaturach $< 20^{\circ}\text{C}$, natomiast u ryb zimnolubnych $> 18^{\circ}\text{C}$.

Wyniki dotychczasowych badań, dotyczących wskaźników patogenności mogą być wykorzystane jedynie w zawężonym zakresie. Konieczne jest przeprowadzenie badań kompleksowych, na wielu gatunkach ryb równocześnie (np. gatunkach ryb najważniejszych pod względem gospodarczym), z jednoczesnym uwzględnieniem najczęściej proponowanych właściwości bakterii *Aeromonas* jako pośrednich wskaźników patogenności, szczególnie takich jak: aktywność hemolityczna i proteolityczna w aspekcie zarówno jakościowym, jak też ilościowym (najlepiej przy wykorzystaniu prostych metod płytkowych i przy użyciu krwinek końskich lub króliczych), odporność na normalną (nieimmunizowaną) surowicę rybią, zachowanie się w płynie fizjologicznym PBS (zdolność autoaglutynacji), zdolność wzrostu w temperaturach 37 i 40°C , zdolność adhezji do powłok skórnych ryb i wytwarzanie fimbrii (pili). Wyjaśnienie możliwości ustalenia uniwersalnych metod diagnostycznych, które mogłyby być wykorzystane w diagnostyce przynajmniej większości przypadków zakażeń wywołanych przez te bakterie, byłoby przydatne także w profilaktyce MAS i MAI u różnych gatunków ryb poprzez badanie obecności zjadliwych szczepów w środowisku i ich nosicielstwa u ryb nie wykazujących objawów chorobowych.

Istnieje także potrzeba kontynuowania badań nad opracowaniem szczepień profilaktycznych. Ostatnio wykazano (badania własne nieopublikowane), że odporność karpia nabyta po ich immunizacji zjadliwymi szczepami *Aeromonas* ma charakter nieswoisty; zabezpiecza ryby przed wystąpieniem choroby po zakażeniu różnymi (pod względem taksonomicznym jak i serologicznym) szczepami z grupy ruchliwych *Aeromonas*. Długotrwałe stosowanie chemioterapeutyków przyczynia się do powstawania szczepów opornych i ich rozprzestrzeniania się, co może prowadzić w przyszłości do występowania znacznie częstszych infekcji spowodowanych przez ruchliwe *Aeromonas*.

Piśmiennictwo

1. Ali A., Carnahan A. M., Altwegg M., Luthy-Hottenstein J., Joseph S. W.: *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 A. hydrophila), a new species isolated from non-human sources. *Med. Microbiol.* 1996, z. 5, 156-165.
2. Allan B. J., Stevenson R. M. W.: Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila*. *Can. Microbiol.* 1981, 27, 1114-1122.
3. Allen D. A., Austin B., Colwell R. R.: *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983, 33, 599-604.
4. Amin N. E., Abdallah J. S., Elallawly, Ahmed S. M.: Motile *Aeromonas septicaemia* among *Tilapia nilotica* (*Sarotherodon niloticus*) in Upper Egypt. *Fish Pathol.* 1985, 20, 93-97.
5. Antychowicz J.: Etiologia i patogenez erythrodermatitis karpia. Praca hab. PI-Wet., Puławy, 1988.
6. Bullock G. L.: Precipitin and agglutinin reactions of *Aeromonads* isolated from fish and other sources. *Bull. Office Int. Epizoot.* 1966, 65, 805-824.
7. Carnahan A. M., Chakraborty T., Fanning G. R., Verna D., Ali A., Janda J. M., Joseph S. W.: *Aeromonas trota* sp. nova, an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 1206-1210.
8. Carnahan A. M., Fanning G. R., Joseph S. W.: *Aeromonas jandaei* (formerly *genospecies DNA group 9 A. sobria*), a new sucrose negative species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 560-564.
9. Chabot D. J., Thune R. L.: Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 1991, 14, 171-176.
10. Del Corral F., Shotts E. B., Brown J.: Adherence, haemagglutination and cell surface characteristics of motile *Aeromonads* virulent for fish. *J. Fish Dis.* 1990, 13, 255-268.
11. Eddy B. P.: Cephalotrichous, fermentative gram-negative bacteria: the genus *Aeromonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 1960, 23, 216-249.
12. Esteve C., Amaro C., Garay E., Santos Y., Toranzo A. E.: Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 78, 555-562.
13. Esteve C., Biosca E. G., Amaro C.: Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water. *Dis. Aquac. Org.* 1993, 16, 15-20.
14. Esteve C., Gutierrez M. C., Ventosa A.: DNA relatedness among *Aeromonas* allosaccharophila strains and DNA hybridization groups of the genus *Aeromonas*. *J. Syst. Bact.* 1995, 45, 390-391.
15. Esteve C., Gutierrez M. C., Ventosa A.: *Aeromonas encheleia* sp. nova isolated from European eels. *J. Syst. Bact.* 1995, 45, 462-466.
16. Ewrel T. E., Lewis D. H., Grumbles L. C.: Comparison of selected diagnostic tests for detection of motile *Aeromonas septicaemia* in fish. *Am. J. Vet. Res.* 1978, 39, 1384-1386.
17. Ewing W. H., Hugh R., Johnson J. G.: W: Studies on *Aeromonas* group. Atlanta, Georgia, USA. U.S. Dep. Health Educ. Welfare Communicable Disease Center, Atlanta, 1961.
18. Figueiredo J., Plumb J. A.: Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*, 1977, 11, 349-354.
19. Heuschmann-Brunner G.: Ein Beitrag zur Erregerfrage der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens. *Allg. Fischerei Ztg.* 1965, 90, 41-49.
20. Heuschmann-Brunner G.: Die *Aeromonaden* der *hydrophila-punctata*. Gruppe bei Süßwasserfischen. *Archiv Hydrobiol.* 1978, 83, 99-125.
21. Hickman-Brenner F. W., Fanning G. R., Arduino M. J., Brenner D. J., Farmer III J. J.: *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1978, 26, 1561-1564.
22. Hickman-Brenner F. W., Mac Donald K. L., Steigerwalt A. G., Fanning G. R., Brenner D. J., Farmer III J. J.: *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase positive species that may cause diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25, 900-906.
23. Hsu T. C., Shotts E. B., Waltman W. D.: Quantitation of biochemical and enzymatic characteristics with pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* complexes in fish. *Proc. Rep. China-Japan. Symp. Fish Dis.*, 1983, s. 47-55.
24. Hsu T. C., Waltman W. D., Shotts E. B.: Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Dev. Biol. Stand.* 1981, 49, 101-111.
25. Huizinga H. W., Esch G. W., Hazon T. C.: Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *J. Fish Dis.* 1979, 2, 263-277.
26. Janda J. A.: Recent advances in the study of taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991, 4, 397-410.
27. Jeney Zs., Jeney G.: Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 1995, 129, 397-420.
28. Kanai K., Wakabayashi H.: Purification and some properties of protease from *Aeromonas hydrophila*. *Bull. Jap Soc. Sci. Fish.*, 1984, 50, 1367-1374.
29. Kou G. H.: Studies on the fish pathogen, *Aeromonas liquefaciens*. I Classification and serological types. *Aquaculture* 1972, 2, 22-33.
30. Kozłńska A.: Wskaźniki patogenności *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas ca-*
viae i *Aeromonas sobria*. Praca dokt. PIWet., Puławy, 1996.
31. Krovacek K.: W: Studies on putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* from fish and aquatic environments. *Grant, Swedish Univ. Agricult. Sci. Fac. Vet. Med.*, Uppsala, 1989, s. 48.
32. Krovacek K., Farris A., Mansson I.: W: Potential virulence factors in *Aeromonas* isolated from fish and water. *Grant. Sect. Bact. Epizoot.*, Dep. Vet. Microbiol., College Vet. Med. Swedish, Univ. Aquacult. Sci, Uppsala, 1989.
33. Lalier R., Daigneault P.: Antigenic differentiation of pili from non-virulent and fish-pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.* 1984, 7, 509-512.
34. Lalier R., Bernard F., Lalonde G.: Difference in the extracellular products of two strains of *Aeromonas hydrophila* virulent and weakly virulent for fish. *Can. J. Microbiol.* 1984, 30, 900-904.
35. Lallier R., Boulanger Y., Olivier G.: Difference in virulence of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in rainbow trout. *Progr. Fish Cult.* 1980, 42, 199-200.
36. Leblanc D. W.: Caractérisation sérologique *Aeromonas mobiles*. Praca mgr Univ. Montreal, Canada, 1981.
37. Leung I. V., Yeops I. V., Lam T. I., Sin Y. M.: Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. *J. Fish Dis.* 1994, 18, 511-518.
38. Liu P. V.: Observations on the specificities of extra-cellular antigens of the genera *Aeromonas* and *Serratia*. *J. Gen. Microbiol.* 1961, 24, 145-153.
39. Ljungh A.: *Aeromonas* toxins and other virulence factors. *Experientia.* 1987, 43, 367-368.
40. Michel C.: A bacterial disease of perch (*Perca fluviatilis* L.) in an Alpine lake: isolation and preliminary study of the causative organism. *J. Wildl. Dis.* 1981, 17, 505-510.
41. Miller R. M., Chapman W. R.: Epistylis and *Aeromonas hydrophila* infections in fishes from North Carolina reservoirs. *Progr. Fish Cult.* 1976, 39, 165-167.
42. Mittal K. R., Lalonde G., Leblanc D., Olivier G., Lalier R.: *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface characteristics. *Can. J. Microbiol.* 1980, 26, 1501-1503.
43. Nieto T. P., Ellis A. E.: Heterogeneity of extracellular proteases produced by different isolates of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* pathogenic for fish. *J. Fish Dis.* 1991, 14, 229-235.
44. Noga E. J.: W: Fish Diseases; Diagnosis and Treatment. Mosby-Year Book Inc., 1995, s. 141.
45. Popoff M.: Genus III *Aeromonas*. W: Krieg N. R., Holt J. G. (red.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. T. 1. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984, s. 545.
46. Popoff M.: A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila* - *Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.* 1976, 94, 11-22.
47. Prost M.: W: Choroby ryb. PTNW, Lublin, 1994, s. 15.
48. Rao V. B., i Foster B. G.: Antigenic analysis of the genus *Aeromonas*. *Texas J. Sci.* 1977, 29, 85.
49. Roberts R. J.: Motile *Aeromonad* septicemia. W: Ignlis V., Roberts R. J., Bromage N. R. (red.) *Bacterial Diseases of Fish*. Inst. Aquacult. Blackwell Science Ltd., Oxford 1993, s. 143.
50. Santos Y., Toranzo A. E., Barja J. L., Nieto T. P., Villa G.: Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect. Immun.* 1988, 56, 3285-3293.
51. Schubert R. H. W., Hegazi M.: *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zbl. Bacteriol. Hyg. A.* 1988, 268, 34-39.
52. Schulz D., Bulling E.: Beitrag zur Ätiologie der Erythrodermatitis des Karpfens. *Zbl. Vet. Med. B.* 1981, 28, 450-482.
53. Shotts E. B., Hsu T. C., Waltman W. D.: Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathol.* 1985, 20, 37-44.
54. Sioutas S., Hoffmann R. W., Pfeil-Putzien C., Fischer-Scherl Th.: Carp Erythrodermatitis (CE) due to an *Aeromonas hydrophila* infection. *Int. Vet. Med. B.* 1991, 38, 186-194.
55. Thune R. L., Graham T. E., Riddle L. N., Amborski R. L.: Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: partial purification and effect on age-0 channel catfish. *Trans. Am. Fisheries Soc.* 1982, 111, 749-754.
56. Thune R. L., Johnson M. C., Graham T. E., Amborski R. L.: *Aeromonas hydrophila* β -hemolysin: purification and examination of its role in virulence in 0-group channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 1986, 9, 55-61.
57. Toranzo A. E., Barja A. M., Romalde J. L., Hetrick F. M.: Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesuer. *J. Fish Dis.* 1989, 12, 439-448.
58. Torres J. L., Tajima K., Shariff M.: Numerical taxonomy and virulence screening of *Aeromonas* spp. isolated from healthy and epizootic ulcerative syndrome-positive fishes. *Asian Fish Sci.* 1993, 6, 11-22.
59. Wakabayashi H., Kanai K., Hsu T. C., Egusa S.: Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* biovar *hydrophila* (Chester) Popoff and Veron, 1976 to fishes. *Fish Pathol.* 1981, 15, 319-325.