

# Szczepienia ryb przeciwko bakteryjnej posocznicy MAS

ALICJA KOZIŃSKA

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

Kościńska A.

## Vaccination of fish against motile aeromonads septicemia (MAS)

### Summary

This paper describes investigations on vaccines against motile aeromonads septicemia (MAS). The disease is caused by motile *Aeromonas* bacteria. The organisms are biochemically, serologically and genetically heterogeneous. This heterogeneity is a major obstacle in successfully developing a vaccine. The efficacy of the vaccines tested were most often evaluated by agglutinating antibody titers in immunised fish serum, however antibodies do not necessarily indicate protective immunity. The fishes indicated partial cross-protection in challenge tests. Recently much effort has been made to establish if cross-protection is induced by the increase of natural non-specific defence mechanisms or the presence some common antigens, which are not detectable in agglutination tests. It is probable that protection against heterologous strains is a result of complex immune mechanisms. Commercial vaccines against motile *Aeromonas* have so far not been available. Only vaccines containing those specific strains responsible for an outbreak of the disease in a particular geographical area may be soon available commercially.

**Keywords:** fish, vaccination, *Aeromonas*.

W ostatnich kilkudziesięciu latach obserwuje się znaczną intensyfikację hodowli ryb. Obok niewątpliwie dużych korzyści gospodarczych wynikających z upowszechniania gospodarki rybackiej, narastają problemy dotyczące między innymi chorób ryb. Ryby są często hodowane w dużym zagęszczeniu, zwykle w monokulturach, predysponujących do występowania chorób powodowanych przez organizmy patogenne, a często także w wyniku stresorów środowiskowych. Zwalczanie tych chorób może być dokonywane różnymi metodami, m.in. przez rozsądne stosowanie leków, zarówno w celach terapeutycznych jak i profilaktycznych, genetyczne selekcje szczepów odpornych na stres i choroby oraz zapobieganie przez użycie szczepionek. Profilaktyka jest znacznie bardziej wskazana niż interwencja w trakcie trwania choroby (32).

Pomimo, że immunizacja ryb jest jeszcze mało rozwinięta, obecnie stosowane są już powszechnie szczepionki przeciwko niektórym chorobom bakteryjnym np. przeciwko wibriozom, jersiniozie, edwardsiellozie, wrzodzienicy łososiowatych. Prawdopodobnie żadna szczepionka przeciwko posocznicy MAS (motile aeromonads septicemia) nie jest jeszcze dostępna na rynku. Wiele gospodarstw rybackich jest jednak zainteresowanych produkcją takiej szczepionki, ze względu na wzrastające znaczenie ruchliwych *Aeromonas*, które są czynnikami etiologicznymi tej choroby.

## Charakterystyka choroby

Bakteryjna posocznica MAS jest chorobą wywołaną przez różne gatunki bakterii z rodzaju *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*), które są powszechnie określane jako ruchliwe *Aeromonas*. MAS występuje często w formie uogólnionej, która objawia się obrzękiem ciała i występowaniem krwawych wybroczyn na powłokach skórnych i w narządach wewnętrznych oraz owrzodzeniem skóry. Czynniki patogenne izoluje się ze zmian skórnych, z narządów wewnętrznych i z krwi. Czasami objawy chorobowe ograniczone są tylko do skóry, na której występują owrzodzenia. W takim przypadku czynnik patogeny izoluje się tylko z tych zmian. Przypadki chorobowe występują często po infekcjach różnych pasożytów, albo jako bezpośrednia infekcja ryb z obniżoną odpornością. Trudno jest jednak odróżnić infekcję bezpośrednią od infekcji wtórnej (2, 35). W hodowlach ryb, zwłaszcza ciepłolubnych, ruchliwe *Aeromonas* stanowią duży problem ekonomiczny.

Bakterie *Aeromonas* wykazujące ruch powodują chorobę u ryb należących do wielu gatunków (ważnych gospodarczo w różnych krajach) takich jak: karp (*Cyprinus carpio* L.) (20, 39), pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*) (26, 31), sumik karłowaty (*Ictalurus punctatus*) (7, 14), tilapia (*Tilapia nilotica*) (2, 30), węgorza (*Anguilla anguilla*) (9, 10). U ryby bass (*Mi-*

*cropterus salmonides*) ruchliwe *Aeromonas* wywołują chorobę określaną jako „red-sore disease” (15).

### Charakterystyka czynnika patogennego

Bakterie należące do grupy ruchliwych *Aeromonas* występują stale w środowisku wodnym oraz jako element fizjologicznej flory w przewodach pokarmowych ryb. Większa liczba tych bakterii jest wykrywana w wodach cieplejszych (21), ale nie jest wyjaśnione, czy wybuch choroby jest związany z mianem tych bakterii w wodzie czy też z fizjologicznym oddziaływaniem ryb przy wyższych temperaturach (15).

W obrębie ruchliwych *Aeromonas* wyróżnia się 3 fenotypowe gatunki: *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria* (33). Szczepy należące do każdego z tych gatunków są znacznie zróżnicowane genotypowo. W wyniku badań molekularnych wyodrębniono 13 grup hybrydacyjnych, z których większość opisano jako nowe gatunki (11, 12, 19). Obecnie w obrębie grupy ruchliwych *Aeromonas* wyróżnia się następujące gatunki genomowe: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (biotypy *sobria* i *veronii*), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia* (5, 6, 11, 16, 17, 37). Dotychczas bardzo niewiele jest danych odnośnie do chorobotwórczości poszczególnych gatunków genomowych dla ryb; wiadomo jest jednak, że patogenne szczepy występują w obrębie wszystkich trzech gatunków fenotypowych *A. hydrophila*, *A. sobria* i *A. caviae* (24, 36).

Szczepy należące do wszystkich tych gatunków są gramujemnymi, fermentującymi pałeczkami wykazującymi ruch dzięki obecności pojedynczej wici umieszczonej biegunowo (33). W obrębie każdego z gatunków fenotypowych występuje duże zróżnicowanie biochemiczne, serologiczne i genetyczne (cyt. 4). Różnice te występują także wśród szczepów zjadliwych dla ryb. Prowadzone były liczne badania dotyczące określenia wspólnych cech charakterystycznych dla szczepów *Aeromonas* patogennych dla ryb. Pomimo, że wyniki tych badań były często kontrowersyjne, określono kilka cech wspólnych, które prawdopodobnie warunkują powstawanie i przebieg procesu chorobowego. Liczni badacze udokumentowali korelację pomiędzy produkcją hemolizyn (1, 24, 36), elastazy (18, 24, 36, 38) oraz ilością wytwarzanych innych proteaz takich jak kazeinaza, żelatynaza, albuminaza i fibrynolizyna (18, 24) a zjadliwością szczepów *Aeromonas* dla ryb. Bardzo silnie związane z patogennością są adhezyny, zlokalizowane prawdopodobnie na fimbriach (24, 27) oraz antygeny powierzchniowe warunkujące odporność szczepów na bakteriobójcze działanie normalnej surowicy (24, 30). Ważną informacją jest, że żadna z tych cech, indywidualnie nie decyduje o przebiegu procesu chorobowego; jest on warunkowany obecnością zespołu cech, które wzajemnie się uzupełniają w wywołaniu i przebiegu choroby (8, 24). Zarówno antygeny powierzchniowe jak i produkty wydzielane zewnątrz-

trzymórkowo mogą być zatem ważnymi antygenami w szczepionkach przeciwko ruchliwym *Aeromonas*. Niektóre produkty zewnątrzkomórkowe są podobne antygenowo u wielu szczepów, np. proteazy (cyt. 40). Takie powszechne antygeny mogą indukować krzyżową odporność przeciwko szczepom z heterologicznymi antygenami powierzchniowymi (40).

### Metody zwalczania MAS

Obecnie w zwalczaniu posocznicy MAS stosowane są antybiotyki, szczególnie oksytetracyklina i nitrofurany oraz flumekina, zarówno w celach leczniczych jak i profilaktycznych. Powszechne stosowanie antybiotyków powoduje jednak wzrost liczby szczepów opornych (3, 13). Wobec tego problemu liczne gospodarstwa prowadzące hodowlę ryb na szeroką skalę są zainteresowane opracowaniem i produkcją efektywnej szczepionki, która mogłaby zastąpić stosowanie antybiotyków.

### Rodzaje eksperymentalnych szczepionek i sposób ich podania

Pomimo wielu trudności w opracowaniu skutecznej szczepionki, prowadzone są eksperymentalne badania (aczkolwiek niezbyt liczne) w tym kierunku.

Bardzo ważny jest wybór szczepu, ze względu na heterogeniczność bakterii *Aeromonas*. Nie ma dotychczas zgody co do tego, czy szczepione ryby uodparniają się przeciwko szczepom heterologicznym; obserwacje różnych autorów nie są jednoznaczne (cyt. 40). Najnowsze badania wskazują, że np. różne gatunki karpia (karp indyjski, karp pospolity) wykazują krzyżowe reakcje odpornościowe, chociaż odporność ta nie dotyczy wszystkich szczepów.

Podobnie jak wszystkie inne szczepionki stosowane u ryb, wakcyny przeciwko MAS są bakteriami (inaktywowane całe komórki bakteryjne). Niektóre badania wykazały, że sposób przygotowania bakteryn istotnie wpływa na odpowiedź immunologiczną. Na przykład Lamers i Van Muiswinkel (28) wykazali, że wakcyny przygotowane z ogrzewanych do 60°C i rozbitych komórek indukowały wyższy poziom przeciwciał aglutynacyjnych niż komórki inaktywowane formaliną. Surowice odpornościowe po immunizacji bakterynami inaktywowanymi formaliną lub termicznie reagowały krzyżowo, ale nie były identyczne. Przeciwciała wytworzone w odpowiedzi na antygen traktowany formaliną reagowały z erytrocytami owcy opłaszczonymi bakteryjnym lipopolisacharydem, w przeciwieństwie do przeciwciał indukowanych antygenem komórek inaktywowanych termicznie. Wymienieni autorzy sugerują, że inaktywacja komórek formaliną zmienia strukturę bakterii *Aeromonas* i w konsekwencji proces przetwarzania ich przez makrofagi, podczas gdy ogrzewany i rozbity antygen mógł uwalniać więcej materiału antygenowego. Efekty immunizacji karpia oceniane wynikami testu challenge wyka-

zały lepszą skuteczność szczepionki przygotowanej z komórek inaktywowanych formaliną niż rozbitych termicznie (Koziańska, obserwacje własne nie opublikowane).

W rozwoju szczepień mają oczywiście duże znaczenie dawka antygeny i droga jego podania. U karpia wymagana jest wysoka dawka wstrzykiwanego antygeny, celem uzyskania wzrostu przeciwciał wkrótce po wakcytacji i długiego okresu utrzymywania się wysokiego miana tych przeciwciał (40). Dobre efekty immunizacji karpia, oceniane testem challenge, obserwowano po wstrzyknięciu dootrzewnowo  $6 \times 10^8 - 1 \times 10^9$  inaktywowanych komórek bakteryjnych. Przy podaniu antygeny w kąpiel, pozytywne efekty uzyskano stosując dawkę co najmniej  $3 \times 10^7$ /ml (nie opublikowane badania własne).

Do immunizacji ryb stosowane są cztery różne metody podawania antygeny: iniekcja (dootrzewnowa, domięśniowa, podskórna), immersja lub kąpiel ryb, spryskiwanie oraz podanie z pokarmem. W większości badań szczepionki przeciwko ruchliwym *Aeromonas* były podawane drogą iniekcji lub immersji. Krausanagar i wsp. (25) wykazali, że po trzykrotnym zastosowaniu szczepionki metodą iniekcji miano przeciwciał aglutynacyjnych u karpia indyjskiego jest dwukrotnie wyższe niż po trzykrotnym szczepieniu metodą immersji. Nie było przy tym różnic w przeżywalności ryb szczepionych drogą iniekcji i immersji. Według Lamers (29) po immersji jest pamięć immunologiczna, ale dopiero po wydłużonym okresie i trwa stosunkowo krótko. Koziańska i Antychowich porównywali efekty immunizacji karpia pospolitego drogą iniekcji dootrzewnowej oraz w kąpiel. Odporność ochronna ryb oceniana była na podstawie wyników testu challenge. W temperaturze 22°C autorzy obserwowali częściową ochronę już po 14 dniach po immunizacji, niezależnie od drogi podania antygeny. W temperaturze 12°C wyraźne efekty immunizacji obserwowano po 28 i 42 dniach. U ryb immunizowanych dootrzewnowo najniższy odsetek zachorowań występował po 28 dniach, natomiast u ryb immunizowanych w kąpiel po 42 dniach (dane nie opublikowane).

### Ocena efektywności szczepionek

W większości badań nad szczepieniami ryb przeciwko ruchliwym *Aeromonas*, efektywność szczepionek była oceniana na podstawie obecności przeciwciał aglutynacyjnych (22, 29, 34, 40). Post (34) uważa, że pstrąg tęczy posiadający miano przeciwciał 1:64 lub wyższe powinien być oceniony jako odporny. Wakcyacja jest rzadko oceniana przez określenie odporności ochronnej, być może z powodu trudności w przeprowadzeniu efektywnego testu challenge (40). Jest to wielka szkoda, ponieważ miano przeciwciał niekoniecznie wskazuje na odporność ochronną. Karpie, w których surowicy wykazano przeciwciała anty *A. hydrophila*, nabyte na drodze naturalnego kontaktu z

określonym szczepem w stawie, po zakażeniu tym szczepem wykazywały znacznie wyższy odsetek zachorowań i śnięć, niż karpie zakażane innymi szczepami. Przeciwnie, obserwowano odporność ochronną immunizowanych karpia przy braku przeciwciał aglutynacyjnych (Koziańska, obserwacje własne nie opublikowane).

Wyniki niektórych badań odporności ochronnej prowadzonych na skalę laboratoryjną są trudne do porównania z powodu znacznych różnic dotyczących sposobu przygotowania szczepionki, drogi jej podania, metody testów challenge oraz wieku i gatunku ryb. W niektórych przypadkach podawano niewystarczające informacje, np. odnośnie temperatury wody, która w sposób istotny może wpływać na odpowiedź immunologiczną. Ponadto temperatura ma duży wpływ na wyniki testów challenge. Karpie przebywające w temperaturze 22-25°C (temperatura optymalna dla tych ryb) przez okres co najmniej 3-4 tygodni, uodparniają się w sposób naturalny, a w konsekwencji zarówno ryby immunizowane jak i kontrolne są w dużym stopniu odporne na zakażenie.

Większość prowadzonych prób nie posiada oceny swoistości ochrony lub czasu jej trwania ponad kilka tygodni. Nie jest zatem wyjaśnione, czy odporność indukowana immunizacją bakteriami ruchliwych *Aeromonas* ma charakter odpowiedzi swoistej, czy jest spowodowana mechanizmami nieswoistymi. Wzrost nieswoistych naturalnych mechanizmów obronnych po immunizacji bakteriami tych drobnoustrojów był przedmiotem zainteresowania niewielu badaczy. Lamers i van Muiswinkel (28) wykazali, że karp ma naturalne aglutyniny przeciwko komórkom *A. hydrophila*. Nie są one jednak immunoglobulinami, przeciwciałami indukowanymi przez wcześniejszy kontakt z *A. hydrophila*. Krausanagar (25) oceniał typ odpowiedzi immunologicznej u karpia indyjskiego na podstawie wyników challenge przy użyciu szczepu homologicznego i heterologicznego. Procent przeżywalności ryb po zakażeniu szczepem heterologicznym był identyczny lub tylko nieco niższy (zależnie od gatunku ryb) niż po zakażeniu szczepem homologicznym. Podobne wyniki uzyskano po immunizacji karpia pospolitego immunizowanych bakteriami *A. hydrophila* i *A. sobria*. Obie szczepionki w dużym stopniu zabezpieczały te ryby przed zakażeniem szczepami heterologicznymi, nawet należącymi do różnych gatunków rodzaju *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. sobria*) (nie opublikowane badania własne). Ochrona krzyżowa ryb przed różnymi szczepami *Aeromonas* może wynikać z dwóch powodów. Po pierwsze jest możliwe, że immunizacja stymuluje niektóre nieswoiste procesy obronne. Druga możliwość jest taka, że szczepy mogą posiadać wspólne antygeny, które nie są wykrywalne w testach aglutynacji (25). Jest bardzo prawdopodobne, że w procesie ochrony krzyżowej współgrają ze sobą zarówno wzmożone przez immunizację mechanizmy nieswoiste jak też przeciwciała skierowane przeciw-

ko wspólnym antygenom. Song i Kou (cyt. 25) wykazali wzmoczenie aktywności fagocytarnej makrofagów u węgorzy immunizowanych przeciwko *Edwardsiella anguillimortifera*. W cyklu badań prowadzonych przez autora prezentowanej pracy (które wkrótce zostaną opublikowane) dotyczących mechanizmów nieswoistych u immunizowanych karpia wykazano znaczny wzrost limfocytów, istotny wzrost współczynnika fagocytarnego granulocytów oraz ich wzmoczoną aktywność metaboliczną. Poziom lizozymu w śluzie i całkowita zdolność bakteriofagowa surowicy i śluzu były znacznie wyższe u ryb immunizowanych niż kontrolnych. Istotny wzrost zahamowania migracji leukocytów występował zarówno w obecności szczepu homologicznego jak też heterologicznego. Wszystkie te parametry korelowały pozytywnie z odpornością ochronną mierzoną testem challenge. Obserwowana częściowa odporność karpia już po 7 dniach wskazuje na uaktywnienie się raczej mechanizmów nieswoistych niż swoistych. Mechanizmy nieswoiste nie są jednak wystarczające do zabezpieczenia ryb przed infekcją wszystkich patogennych szczepów ruchliwych *Aeromonas*. Pozytywne efekty immunizacji wykazano po zakażeniu pięcioma (z 7 badanych) szczepami heterologicznymi *Aeromonas sp.* Prawdopodobnie posiadały one wspólne antygeny, w przeciwieństwie do dwóch pozostałych szczepów. Nie były to jednak antygeny indukujące powstawanie aglutynin. Indukowały one natomiast wspólne precypityny w surowicy uodpornianych królików. Większość patogennych szczepów ruchliwych *Aeromonas* posiada antygeny indukujące wytwarzanie precypityn, które reagują krzyżowo, chociaż nie są identyczne (23). Obecność precypityn może okazać się lepszym wskaźnikiem efektywności szczepień niż aglutyniny.

### Perspektywy rozwoju szczepień i komercjalizacji szczepionek

Największym problemem ograniczającym rozwój szczepień przeciwko ruchliwym *Aeromonas* jest duże zróżnicowanie antygenowe tych bakterii. Problem ten jednak można przezwyciężyć wówczas, gdy możliwa będzie identyfikacja powszechnie występujących antygenów indukujących krzyżowe procesy obronne (40). Obecnie wiadomo jest, że tylko niektóre szczepy ruchliwych *Aeromonas* są patogenne dla ryb. Gdyby udało się wśród tych szczepów zidentyfikować kilka antygenów, powodujących wystarczającą krzyżową obronę organizmu ryby, wówczas standardowy typ bakteryn może być brany pod uwagę w rozwoju szczepień. Jeżeli w ten sposób problem heterogeniczności szczepów nie może być przezwyciężony, alternatywnym sposobem ochrony ryb przed posocznica MAS może być podniesienie naturalnych mechanizmów odporności (40). Jednym ze środków wzmagających te mechanizmy jest właśnie szczepionka. Jednak perspektywy opracowania monowalentnej szczepionki chroniącej ryby przed wszystkimi szczepami *Aeromo-*

*nas sp.* są mało prawdopodobne (32). Prawdopodobnie istnieją niewielkie szanse na uzyskanie w najbliższym czasie standardowej uniwersalnej szczepionki. Niektórzy badacze (cyt. 32) uważają, że do tego celu wykorzystane mogą być wakcyny zawierające tylko te swoiste szczepy, które są odpowiedzialne za wybuch choroby na stosunkowo wąskim obszarze. W takim przypadku wystąpi jednak niewątpliwie problem braku zainteresowania firm produkujących szczepionki, ze względu na ograniczony ich odbiór.

Upowszechnienie stosowania szczepionki jest ograniczone ponadto względami ekonomicznymi. W niektórych krajach, ze względu na koszty, byłaby ona zakazana. Na niektórych obszarach stosowanie szczepionki byłoby limitowane do skrajnych sytuacji, gdzie posocznica MAS pojawia się regularnie w określonych odstępach czasu. Niestety, często zdarzają się sytuacje, w których infekcje pasożytnicze lub stosowanie antybiotyków osłabia wrażliwość immunologiczną ryb na szczepionki (40). U ryb ważne jest aby szczepionka była zastosowana w odpowiednim okresie i być może powtórzona, aby była wystarczająco skuteczna w warunkach najbardziej sprzyjających do wystąpienia choroby.

Wobec tego, że wakcynacja przez immersję z komórkami inaktywowanymi formaliną jest zabezpieczająca (35), tylko taka szczepionka mogłaby być produkowana na skalę przemysłową (32). Jest ona łatwa w przygotowaniu i niedroga. Szczepienie ryb metodą iniekcji byłoby mało opłacalne ekonomicznie, ponieważ dochodziłyby koszty przeprowadzenia szczepień, wymagających dużego nakładu pracy.

### Piśmiennictwo

- Allan B. J., Stevenson R. M. W.: Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. Microbiol.* 1981, 27, 1114-1122.
- Amin N. E., Abdallah I. S., Elallawy T., Ahmed S. M.: Motile *Aeromonas* septicemia among *Tilapia nilotica* (*Sarotherodon niloticus*) in Upper Egypt. *Fish Pathol.* 1985, 20, 93-97.
- Aoki T., Egusa S., Ogata Y., Watanabe T.: Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 1971, 65, 343-349.
- Austin B., Austin D. A.: Bacterial fish pathogens. W: Ellis Horwood Limited, New York, 1987, s. 172.
- Carnahan A. M., Chakraborty T., Fanning G. R., Verna D., Ali A., Janda J. M., Joseph S. W.: *Aeromonas* *trota* species nova, an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 1206-1210.
- 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.
- Chabot D. J., Thume R. L.: Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterisation and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 1991, 14, 171-175.
- Del Corral F., Shotts E. B., Brown J.: Adherence, haemagglutination and cell surface characteristics of motile *Aeromonas* virulent for fish. *J. Fish Dis.* 1990, 13, 255-268.
- 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.
- Esteve C., Biosca E. G., Amaro C.: Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared fresh water. *Dis. Aq. Org.* 1993, 16, 15-20.

11. Esteve C., Gutiérrez M. C., Ventosa A.: *Aeromonas encheleia* sp. nova isolated from European eels. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, 45, 462-466.
12. Esteve C., Gutiérrez M. C., Ventosa A.: DNA relatedness among *Aeromonas* allosaccharophila strains and DNA hybridization groups of the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, 45, 390-391.
13. Fass R. J., Barnishan J., Helsel V. L.: Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides*. *Exp.* 1987, 43, 360-361.
14. Figueiredo J., Plumb J. A.: Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquacult.* 1977, 11, 349-354.
15. Hazen T. C., Esch G. W., Glassman A. B., Gibbons J. W.: Relationship of season, thermal loading and red-sore disease with various haematological parameters in *Micropterus salmonides*. *J. Fish Biol.* 1978, 12, 491-498.
16. 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.* 1988, 26, 1561-1564.
17. Hickman-Brenner F. W., Mac Donald K. L., Steigerwald 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.
18. 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.
19. Janda J. M.: Recent advances in the study of taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991, 4, 397-410.
20. Jeney Zs., Jeney G.: Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacult.* 1995, 129, 397-420.
21. Kaper J. B., Lockman H., Colwell R. R.: *Aeromonas hydrophila*: ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *J. Appl. Bacteriol.* 1981, 50, 359-377.
22. Khalifa K. A., Post G.: Immune response of advanced rainbow trout fry to *Aeromonas liquefaciens*. *Progr. Fish-Cult.* 1976, 38, 66-68.
23. Kozłowska A.: Właściwości immunogenne wybranych szczepów *Aeromonas* species dla ryb. *Praca oddana do druku w Med. Wet.*
24. Kozłowska A.: Wskaźniki patogenności *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* i *Aeromonas sobria*. *Praca dokt. PIWet, Puławy, 1996.*
25. Krausanagar I., Rosalind G., Krausanagar I.: Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *J. Fish Dis.* 1991, 14, 413-417.
26. 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.
27. Lallier R., Daigneault P.: Antigenic differentiation of pili from non-virulent and fish pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.* 1984, 7, 509-512.
28. Lamers C. H. J., Van Muiswinkel W. B.: Natural and acquired agglutinins to *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1986, 43, 619-624.
29. Lamers C. J., De Haas M. J. M., Van Muiswinkel W. B.: The reaction of immune system of fish vaccination. Development of immunological memory in carp *Cyprinus carpio* following direct immersion in *Aeromonas hydrophila* bacterin. *J. Fish Dis.* 1985, 8, 253-262.
30. Leung I. V., Yeep 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.
31. Mittal K. R., Lalonde G., Leblanc T., Olivier G., Lallier R.: *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface characteristics. *Can. J. Microbiol.* 1980, 26, 1501-1503.
32. Newman S. G.: Bacterial vaccines for fish. *Ann. Rev. Fish Diseases* 1993, 145-185.
33. Popoff M.: Genus III *Aeromonas*. W: Krieg N. R., Holt J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* t. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, s. 545-548.
34. Post G.: Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to antigens of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Res. Board Can.* 1966, 23, 1487-1494.
35. Ruangapan L., Kitao T., Yoshida T.: Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia. *Vet. Immunol.* 1986, 12, 345-350.
36. 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.
37. Schubert R. H. W., Hegazi M.: *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zbl. Bact. Hyg. A.* 1988, 268, 34-39.
38. Shotts E. B., Hsu T. C., Waltman W. D.: Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathol.* 1985, 20, 37-44.
39. Sioutas S., Hoffman 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.
40. Stevenson R. M. W.: Vaccination against *Aeromonas hydrophila*. W: Ellis A. E.: *Fish vaccination*. Academic Press, London, 1988, s. 112-123.

Adres autora: dr Alicja Kozłowska, ul. Kusocińskiego 1/25, 24-100 Puławy

**SAEGERMAN C., VO T. K. O., DE VAELE E., GILSON D., BASTIN A., DUBRAY G., FLANGAN P., LIMET J. N. M LETESSON J. J., GODFIRD J.: Rozpoznawanie brucellozy bydła testem skórny: warunki wykonania testu i ocena jego przydatności. (Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance). *Vet. Rec.* 145, 214-218, 1999 (8)**

Brucelinę otrzymaną z *Brucella melitensis* B115 (Rhone-Merieux) zastosowano jako alergen w teście alergicznym wykrywania brucellozy u bydła. W celach porównawczych zastosowano testy standardowe: odczyn aglutynacji próbki w obecności EDTA (SAW-EDTA), odczyn wiązania dopełniacza, test pośredni ELISA, test tuberkulinowy z użyciem PPD. Wyniki testu skórno-odczytano po 72 godz. Odczyn alergiczny na brucelinę był 2-3 krotnie słabszy od odczynu tuberkulinowego i dlatego powiększenie grubości fałdu skórno-o 1,1 mm uznano za wartość graniczną. Swoistość testu z bruceliną oceniona na 1192 krowach wolnych od brucellozy wynosiła 99,83%, zaś czułość określona na 27 jałówek zakażonych eksperymentalnie wynosiła 93% po miesiącu i 95% po 6 miesiącach po zakażeniu. Alergia u szczepionych krów utrzymywała się przez okres 4,5 roku. Test alergiczny łącznie z odczynami serologicznymi umożliwia ocenę stanu zakażenia i pozwala na odróżnienie odczynów fałszywie dodatnich spowodowanych infekcją *Yersinia enterocolytica*.

G.

**LAEVENS H., KOENER F., DELUYKER H., DE KRUIF A.: Doświadczalne zakażenie świń rzeźnych wirusem klasycznego pomoru świń: transmisja wirusa, przebieg choroby, odpowiedź serologiczna. (Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus: transmission of the virus, course of the disease and antibody response). *Vet. Rec.* 145, 243-248, 1999 (9)**

Rozprzestrzenienie się wirusa klasycznego pomoru świń badano w izolowanych kojcach, każdy po 6 zwierząt pochodzących z jednego stada wolnego od zakażenia tym wirusem i wirusem biegunki bydła (BVD). Warunki eksperymentu umożliwiły ocenę roli jaką odgrywa odzież, sprzęty stosowane do karmienia, ruch powietrza oraz sam personel w rozprzestrzenianiu choroby. Jedno zwierzę w jednym kojcu zakażono domięśniowo (2 ml) i donosowo (2 ml) szczepem terenowym wirusa klasycznego pomoru świń. Przez okres 62 dni badano zwierzęta wirusologicznie oraz w odczynach serologicznych. Wirus był wysoce zakaźny dla pozostałych 5 zwierząt w kojcu. Transmisja wirusa do zwierząt w pozostałych kojcach miała miejsce z chwilą wystąpienia wirerii. Wirus rozprzestrzenił się za pośrednictwem sprzętów, ubiorów personelu oraz drogą powietrza. Sposób zakażenia nie wpływał na przebieg kliniczny choroby oraz nasilenie serokonwersji.

G.