

Ektoproteazy *Aeromonas salmonicida* i ich znaczenie w patogenezie i immunoprofilaktyce wrzodzienicy ryb

MARIA PROST

Lublin

Prost M.

Extracellular proteases ECP of *Aeromonas salmonicida* and their significance in the pathogenesis and immuno-prophylaxis of fish furunculosis

Summary

Many bacteria, including those of the *Aeromonas* family, produce and secrete various extra-cellular substances, including enzymatic proteins, which are often eggotoxic in nature. This article describes the characteristics of extracellular proteases ECP of the *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*, their importance in pathogenesis of salmonids furunculosis and their immunogenic activity. Of the entire range of extracellular proteases (ECP), the most important in terms of their furunculosis pathogenesis are: serine protease, glycerophospholipide: cholesterol acyltransferase (GCAT) and metalloprotease. The toxic level of GCAT for fish increases if it appears in a lipopolysaccharide LPS complex. The pathogenicity of this complex increases even more under the influence of serine protease. The significance of metalloprotease in pathogenesis of furunculosis lies in the fact that it destroys collagen in fish tissues. Research on the immunogenic activity of extracellular proteases ECP and the possibility of using them in immune prophylaxis of salmonids furunculosis has so far not show satisfactory results. The most promising seems to be the antigen properties of the GCAT/LPS complex. There is also a possibility of using the immunostimulatory effect of the whole range of ECP proteases. Nonetheless, the heterogeneity of this protein requires further research on modifying the ECP in such a way that it would contain a majority of antibodies against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. This would allow the ECP antigen to increase its activity.

Keywords: extracellular proteases ECP, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, immunogenic properties of ECP

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* jest bakterią wywołującą wrzodzienicę ryb łososiowatych. Choroba ta powoduje duże straty ekonomiczne, zwłaszcza w warunkach hodowlanych. Większość publikacji ostatnich lat dotyczy jednak głównie objawów, zmian patologicznych oraz zwalczania wrzodzienicy. Dopiero ostatnio ukazało się szereg prac poświęconych patogeniezie oraz nowym metodom immunoprofilaktyki tej choroby. Stosowane dotąd szczepionki przeciw wrzodzienicy nie dają bowiem zadowalających efektów. Zwrócono stąd uwagę na ektoproteazy, tj. enzymy proteolityczne wydzielane pozakomórkowo przez *A. salmonicida*.

Charakterystyka ektoproteaz *A. salmonicida*

Bakterie *A. salmonicida* produkują wiele związków, w tym kilkadziesiąt białek, z których szereg ma charakter enzymów. Pierwsze doniesienia o tego rodzaju ich aktywności pochodzą z 1962 r. (14). Wiele bakterii wytwarza pozakomórkowe proteazy służące rozkładowi tkanek zakażonej ryby i wykorzystywaniu produktów tego metabolizmu jako materiału odżywcze-

go. Innym celem działania tych enzymów jest ułatwienie bakterii penetracji tkanek ryby w następstwie aktywności proteolitycznej. Niektóre z tych proteaz mają właściwości hemolityczne.

Ektoenzymy proteolityczne działają degradująco głównie na białka o niedużej masie cząsteczkowej i dość luźnej strukturze przestrzennej, jak np. kazeina i albumina. Białka te są rozkładane do peptydów, zbudowanych z niewielkiej liczby aminokwasów. Większość bakterii, w tym *A. salmonicida*, jest bowiem zdolna pobierać jako pokarm tylko fragmenty białko- we złożone najwyżej z pięciu aminokwasów (6).

Ektoenzymy proteolityczne są syntetyzowane na grupach rybosomów (polisomach), związanych z błoną komórkową bakterii (4). Synteza ta jest zależna od temperatury: bardziej intensywna w niższej, a znacznie mniejsza w wyższej (25-32°C) (13). Wśród proteaz pozakomórkowych ECP (extracellular proteases) tylko niektóre z nich, jak wykazały badania, są odpowiedzialne za toksyczność, patogenność i letalność dla ryb. Są nimi głównie: proteaza serynowa, acetylotransferaza glicerofosfolipidowa cholesterolu GCAT (gly-

cerophospholipide cholesterol acyltransferase), zwłaszcza gdy występuje w kompleksie z lipopolisacharydem (LPS) oraz metaloproteazą.

Proteaza serynowa jest enzymem o masie cząsteczkowej 70 kDa (22). *In vitro* rozkłada kazeinę, żelatynę i albuminę. Do wzrostu na podłożu hodowlanym wymaga co najmniej siedmiu aminokwasów: glicyny, alaniny, waliny, treoniny, lizyny, metioniny i histydyny (26). Białko to wykazuje dużą oporność na działanie wielu związków występujących w krwi ryb, jak np. na antytrombinę III i α_1 antyproteazę. Najsilniejsze działanie inhibujące proteazę serynową wykazuje α_2 makroglobulina (6, 22, 27, 28).

Do gatunku *Aeromonas salmonicida* należy kilka podgatunków: *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *A. salmonicida subsp. achromogenes* i *A. salmonicida subsp. smithia*. Tylko ta pierwsza uważana jest za typowy gatunek, pozostałe określane są jako atypowe. Proteaza serynowa jest produkowana tylko przez *A. s. subsp. salmonicida*, gdyż jedynie ona ma w swoim DNA gen kodujący ten enzym. Mutanty tego podgatunku nie mające wymienionego genu nie produkują proteazy serynowej. Właściwość ta może być, według niektórych autorów (32), czynnikiem różnicującym *S. salmonicida* typowe od atypowych. Nie tylko *A. salmonicida*, ale również i inne gatunki *Aeromonas* mogą wytwarzać proteazę serynową. Stwierdzono to u *A. hydrophila* (17, 20), *A. sobria* i *A. caviae*. Niektórzy autorzy twierdzą nawet, że istnieje duże podobieństwo między proteazą serynową produkowaną przez *A. hydrophila* i *A. salmonicida subsp. salmonicida* (17).

Oprócz proteazy serynowej *A. salmonicida subsp. salmonicida* wytwarzać może pozakomórkowo także inną proteazę: acetylotransferazę glicerofosfolipidową – GCAT. Tworzy ona najczęściej kompleks z lipopolisacharydem. Kompleks ten ma masę cząsteczkową 2000 kDa, zaś sama transferaza GCAT 25 kDa (5, 15). Stwierdzono, że transferaza GCAT nie związana z LPS jest bardziej podatna na proteolityczną inaktywację i bardziej termolabilna niż kompleks GCAT/LPS. Poza tym połączenie GCAT z LPS powoduje znaczne zwiększenie wirulencji tej egzotoksyny (15). Produkcję GCAT stwierdzono też u *A. hydrophila*, a geny tego gatunku i *A. salmonicida subsp. salmonicida* kodujące ten enzym mają bardzo podobną sekwencję nukleotydu (5). *A. salmonicida subsp. salmonicida* wytwarza pozakomórkowo także metaloproteazę o masie cząsteczkowej 37 kDa. Hydrolizuje ona żelatynę i kolagen. Stymulatorem jej aktywności są jony wapnia (2). Fizykochemiczne właściwości tej proteazy nie są jeszcze dokładnie poznane (6).

Znaczenie ektoproteaz w patogenezie wrzodzeniicy

Badania eksperymentalne nad rolą proteazy serynowej w procesie chorobowym u ryb łososiowatych wykazały, że po podaniu domięśniowym wywołuje ona owrzodzenia typowe dla wrzodzeniicy (24, 25). Wprowadzenie tej proteazy dootrzewnowo jest śmiertelne

dla ryb łososiowatych (19). Jej toksyczność jest jednak mniejsza niż całego zespołu proteaz ECP (6), przy których śmiertelność ryb jest dużo większa, z pojawieniem się ognisk nekrotycznych. Należy więc sądzić, że w ECP oprócz proteazy serynowej występują także inne białka patogenne dla ryb. Zmiany patologiczne u ryb, którym podano proteazy ECP były wyraźnie zaznaczone, ale nie stwierdzono ich po wprowadzeniu proteazy serynowej (9, 10).

Proteaza serynowa ma właściwości hemolityczne. W patogenezie wrzodzeniicy największe znaczenie ma jej zdolność do szybszego krzepnięcia krwi (21). Ta właściwość powoduje tworzenie się zakrzepów w sercu oraz w naczyniach krwionośnych. Widocznym tego objawem jest błądność skrzeli.

Acetylotransferaza glicerofosfolipidowa cholesterolu jest najbardziej wirulentną egzotoksyną spośród wszystkich proteaz wchodzących w skład ECP. Jej toksyczność zwiększa się ośmiokrotnie w kompleksie z LPS (15). Dawka letalna GCAT/LPS dla łososia wynosi 0,045 μ g proteiny na gram ciała ryby (15), zaś LD₅₀ po podaniu w iniekcji 45 ng na gram ciała ryby (6).

Kompleks GCAT/LPS może współdziałać z proteazą serynową, co znacznie wzmacnia efekt działania patogennego. Jest to głównie wynikiem silnej aktywacji cytolitycznej (w tym erytrocyto i leukocytolitycznej). Oprócz działania hemolitycznego GCAT/PLS powoduje lizę włókien mięśniowych. Wpływa to stymulująco na tworzenie się przy wrzodzeniicy typowych owrzodzeń na powierzchni ciała. Działanie cytolityczne na kwasochłonne komórki powoduje ich degranulację w skrzelach i jelitach. Efektem tego jest uwolnienie się z nich histaminy, która przyspuszczalnie wywołuje zaburzenia funkcji układu krwionośnego. Ostatnim efektem jest niedokrwienie i błądność skrzeli oraz trudności w oddychaniu (16).

Działanie lityczne na erytrocyty krwi jest szczególnie silne gdy GCAT/LPS działa wspólnie z proteazą serynową. Badania wykazały (16), że transferaza powoduje jedynie uszkodzenie błony komórkowej i podział jej na fragmenty, zaś całkowita liza resztek erytrocyta jest powodowana przez proteazę serynową. Wynacznienia w tkankach ryb chorych na wrzodzenię, typowe zwłaszcza w tkance mięśniowej, są więc związane ze wspólnym działaniem cytolitycznym GCAT/LPS oraz proteazy serynowej. Aktywność hemolityczna obu tych proteaz nie występuje w stosunku do krwi nek ssaków. Wynika to przypuszczalnie z odmienności budowy fosfolipidów w błonach erytrocytów ryb i ssaków. Błona tych komórek u ryb zawiera znacznie mniej nasyconych kwasów tłuszczowych (6).

Znaczenie metaloproteazy w patogenezie wrzodzeniicy jest związane przede wszystkim z jej aktywnością w degradacji kolagenu. Powoduje ona rozluźnienie struktury tkanki łącznej w narządach ryb. W wyniku tego zostaje ułatwiona penetracja *A. salmonicida* oraz wydzielanych przez nią egzotoksyn w organizmie chorych ryb (2).

Metaloproteazy są egzotoksynami wydzielanymi nie tylko przez bakterie. Zdolność tę mają i pierwotniaki. Z danych piśmiennictwa wiadomo, że te zewnątrzkomórkowe proteazy są wydzielane np. przez *Cryptobia salmositica*, pasożyta patogennego dla ryb łososiowatych, przez *Trypanosoma cruzi* i *Entamoeba histolytica*. Metaloproteaza *Cryptobia salmositica* ma masę cząsteczkową 200 kDa i własności kolagenolityczne. Jest wydzielana do krwi ryb, gdzie wywołuje hemolizę krwinek (33). Działanie chorobotwórcze tego pasożyta dla ryb łososiowatych jest wyraźnie związane z produkcją metaloproteazy. Stwierdzono bowiem, że pierwotniaki te hodowane *in vitro* tracą zdolność produkcji metaloproteaz i tym samym przestają być patogenne (33).

Aktywność immunogenna ektoproteaz *A. salmonicida subsp. salmonicida*

Pomimo wieloletnich prac doświadczalnych nad opracowaniem szczepionki skutecznej przeciw wrzodzienicy, wyniki praktycznego jej stosowania u ryb łososiowatych nie są dotąd zadowalające. Stale ponawiane są próby uzyskania nowych, bardziej skutecznych antygenów, przydatnych do immunoprofilaktyki tej choroby. Wyniki badań nad ektoproteazami *A. salmonicida subsp. salmonicida* zachęciły badaczy do sprawdzenia możliwości ich użycia jako antygenów do wakcynacji. W pracach na ten temat badano aktywność immunogenną całego zespołu proteaz pozakomórkowych *A. salmonicida*, proteazy serynowej, transferazy GCAT oraz kompleksu tej ostatniej z LPS. Badania te nie dały jednoznacznych wyników. W niektórych pracach dotyczących aktywności immunogennej proteazy serynowej (29) stwierdzono, że jest ona skutecznym antygenem. Próby zastosowania u ryb szczepionki zawierającej ten enzym dały bowiem pomyślne wyniki. Szczepionkę podano łososiom w iniekcji domięśniowej czterokrotnie w odstępach tygodniowych. Odporność ryb sprawdzano metodą challenge podając im po miesiącu patogenny szczep *A. salmonicida subsp. salmonicida*. Ryby szczepione nie zachorowały, zaś nie szczepione wszystkie padły. Stwierdzono przy tym, że proteaza serynowa użyta do szczepień może pochodzić zarówno z patogennych, jak i niepatogennych szczepów tej bakterii (29, 30).

Badania nad budową genu kodującego proteazę serynową (3) oraz nad sekwencją aminokwasową tego białka wykazały, że zawiera ono epitop rozpoznający przeciwciała przeciw wydzielanej przez *A. salmonicida subsp. salmonicida* proteazie serynowej. Autorzy pracy wysuwają stąd wniosek, że egzotoksyna ta powinna być skutecznym antygenem do immunoprofilaktyki wrzodzienicy. Pomimo tak przekonującego dowodu, dalsze badania (1) nie potwierdziły jej skutecznej aktywności antygenowej. Oczyszczona proteaza serynowa użyta do immunizacji łososi nie wywołała bowiem odporności u tych ryb. Ci sami autorzy sprawdzili również odpowiedź immunologiczną łososi po podaniu szczepionek zawierających transferazę

GCAT, kompleks AGCT/LPS oraz cały zespół ECP. Według tych badań, podobnie jak proteaza serynowa, transferaza GCAT oraz ECP nie wywołują silnej odpowiedzi immunologicznej u łososi. Wprawdzie pojawiały się specyficzne dla nich przeciwciała, ale brak było odporności na powtórne zakażenie. Kontrolę odporności wykonywano po sześciu tygodniach i po trzech miesiącach po szczepieniu. Lepszy efekt uzyskano stosując szczepionkę zawierającą oprócz tych antygenów również i zabite bakterie *A. salmonicida subsp. salmonicida*.

W wyniku innych badań uzyskano bardzo wyraźną odpowiedź immunologiczną u łososi po dootrzewnowej immunizacji kompleksem CGAT/LPS. Autorzy pracy sądzą, że LPS działa w tym kompleksie jako adjuwant antygeny. Do szczepienia ryb łososiowatych o masie 100 g polecają dawkę szczepionki wynoszącą 0,2 mg w 1 ml buforu PBS (1).

Słaba immunogenność proteazy serynowej oraz całego zespołu ECP u ryb łososiowatych skłoniła do dalszych badań nad sposobami wzmocnienia ich właściwości antygenowej. Okazało się, że lepszą odpowiedź immunologiczną można uzyskać podając rybom surowicę odpornościową królików immunizowanych proteazą serynową lub ECP. Bierne szczepienie pstrągów tego rodzaju surowicą daje znacznie lepszą odpowiedź w postaci miana przeciwciał niż podanie bezpośrednie obu tych natywnych antygenów (7, 12, 18).

Na temat immunogenności metaloproteaz produkowanych przez *A. salmonicida subsp. salmonicida* brak jest bliższych informacji. Przypuszczalnie stymulują one odpowiedź immunologiczną. Można o tym sądzić biorąc pod uwagę wyniki badań (11) nad aktywnością mitogenną leukocytów łososi po podaniu im metaloproteazy o masie cząsteczkowej 20 kDa produkowanej przez *A. salmonicida subsp. achromogenes*. Antygen ten (nazwany przez autorów $AsaP_1$) po dootrzewnowym podaniu łososiom daje bardzo wyraźną odpowiedź, wyrażającą się wzmożoną proliferacją leukocytów, w tym limfocytów T.

Należy zaznaczyć, że podobny efekt wzmożonej aktywności mitogennej leukocytów z nerki główowej stwierdzono u karpia po podaniu im supernatantu z hodowli *A. salmonicida subsp. achromogenes*, bakterii wywołującej u tych ryb chorobę pod nazwą *erythrodermatitis*. Autorzy pracy (23) stwierdzili ponadto, że reakcja ta występuje głównie u młodych, blastycznych form leukocytów. Wyniki tych badań świadczą o immunogennych właściwościach ECP produkowanych przez *A. salmonicida subsp. achromogenes*. Próby szczepienia karpia częściowo oczyszczonymi białkami ECP wykazały, że u ryb tych można uzyskać odporność przeciw tym bakteriom. Dalsze badania (8) wykazały, że po iniekcji ECP wykonanej dwukrotnie uzyskano znacznie lepszą przeżywalność szczepionych karpia niż po podaniu LPS lub białka błon komórkowych A-layer, a także po zastosowaniu jako antygeny zabitych bakterii.

W ogólnej ocenie możliwości wykorzystania proteaz ECP jako antygeny w immunoprofilaktyce wrzodzienicy ryb łososiowatych należy stwierdzić, że wyniki dotychczasowych badań na ten temat nie są dostatecznie zadowalające. Największe nadzieje można pokładać we właściwościach antygenowych kompleksu CGAT/LPS. Zastosowanie do immunizacji całego zespołu proteaz ECP wymaga ich uprzedniego przygotowania. ECP zawiera bowiem wiele proteaz o różnych właściwościach antygenowych. Według danych piśmiennictwa (31) niektóre z nich mają własności immunostymulujące, inne wręcz immunosupresyjne. Stąd też do ewentualnych szczepień należałoby użyć ECP zmodyfikowanych w ten sposób, by przeważały w nich epitopy rozpoznające przeciwciała przeciwko *A. salmonicida subsp. salmonicida*. Pierwsze badania nad modyfikacją ECP zostały wykonane w 1991 r. (31). Spośród wielu różnych prób najlepsze działanie immunostymulujące przeciw *A. salmonicida subsp. salmonicida* miały ECP związane z adjuwantem. Podawane były dootrzewnowo łososiom o masie 10 g.

Z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa na temat pozakomórkowych proteaz *A. salmonicida subsp. salmonicida* wynika, że istnieje realna możliwość użycia ich jako antygenów do szczepionek przeciw wrzodzienicy. Konieczne są jednak jeszcze dalsze badania nad wzmocnieniem ich aktywności antygenowej.

Piśmiennictwo

1. Arnesen J. A., Bjørnsdottir R., Jørgensen T. Ø., Eggset G.: Immunological responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., against purified serine protease and haemolysins from *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 1993, 16, 409-423.
2. Arnesen J. A., Eggset G., Jørgensen T.: Partial purification and characterisation of extracellular metalloproteases from *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. J. Fish Dis. 1995, 18, 283-295.
3. Bennet A. J., Whitby P. W., Coleman G.: Retention of antigenicity by a fragment of *aeromonas salmonicida* 70 kDa serine protease which includes the primary substrate binding site expressed as β -galactosidase hybrid protein. J. Fish. Dis. 1992, 15, 473-484.
4. Campbell C. M., Duncan D., Price N. C., Stevens L.: The secretion of amylase, phospholipase and protease from *Aeromonas salmonicida* and the correlation with membrane-associated ribosomes. J. fish Dis. 1990, 13, 463-474.
5. Eggset G., Bjørnsdottir R., McQueen R., Leifson R., Arnesen J. A.: Extracellular glycerophospholipide: cholesterol acyltransferase from *Aeromonas salmonicida*; activation by serine protease. J. Fish Dis. 1994, 17, 17-29.
6. Ellis A. E.: An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. J. Fish Dis. 1991, 14, 265-277.
7. Ellis A. E., Burrows A. S., Hastings T. S., Stapleton K. J.: Identification of *Aeromonas salmonicida* extracellular protease antigen against furunculosis by passive immunization. Aquaculture 1988, 70, 207-218.
8. Evenberg D., de Graff P., Lugtenberg B.: Vaccine induced protective immunity against *Aeromonas salmonicida* tested in experimental carp erythrodermatitis. J. Fish Dis. 1998, 11, 337-350.
9. Fyfe L., Coleman G., Munro A. L. S.: Identification of major common extracellular proteins secreted by *Aeromonas salmonicida* strains from diseased fish. Appl. Environ. Microbiol. 1987, 53, 722-726.
10. Fyfe L., Finley A., Coleman G., Munro A. L. S.: A study of the pathological effect of isolated *Aeromonas salmonicida* extracellular protease on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis 1986, 9, 403-409.
11. Gudmundsdottir S., Magnodottir B., Gudmundsdottir B. K.: Effects of antigens from *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes* on leukocytes from primed and unprimed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Fish Shellfish Immunol. 1995, 5, 493-504.
12. Hastings T. S., Ellis A. E.: The humoral immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and rabbits to *Aeromonas salmonicida* extracellular products. J. Fish Dis. 1998, 11, 147-160.
13. Ihiguro E. E., Kay W. W., Ainsworth T., Chamberlain J. B., Austen R. A., Buckley J. T., Trust T. Y.: Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. J. Bacteriol. 1981, 148, 333-340.
14. Karlsson K. A.: Studies on the haemolysis of *Aeromonas salmonicida*. Nordisk Veterinarmed. 1962, 14, suppl. 2, 60.
15. Lee K. K., Ellis A. E.: Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) in a major lethalexotoxin and cytolyisin of *Aeromonas salmonicida*; LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. J. Bacteriol. 1990, 172, 5382-5393.
16. Lee K. K., Ellis A. E.: The role of the lethal extracellular cytolyisin of *Aeromonas salmonicida* in the pathology of furunculosis. J. Fish Dis. 1991, 14, 453-460.
17. Leung K. Y., Stevenson M. W.: Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. J. Gen. Microbiol. 1988, 134, 151-160.
18. Lund V., Jørgensen T., Holm K. O., Eggset G.: Humoral immune response in Atlantic salmon, L. to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 1991, 14, 443-452.
19. Munro A. L., Hastings T. S., Ellis A. E., Liversidge J.: Studies on an ichthyotoxic material produced extracellularly by the furunculosis bacterium *Aeromonas salmonicida*. W: Fish Diseases W. Ahre. (wyd.) Springer Verl., Berlin, 1980, s. 98-106.
20. Nieto T. P., Ellis A. E.: Characterization of extracellular metal- and serine proteases of *Aeromonas hydrophila* strain B₁. J. General Microbiology 1986, 132, 1975-1979.
21. Price N. L., Ranks R. M., Campbell C. M., Duncan D., Stevens L.: The specificity of the maju (70 kDa) protease secreted by *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 1990, 13, 49-58.
22. Price N. C., Stevenson L., Duncan D., Snodgrass M.: Protease secreted by strains of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 1989, 12, 223-232.
23. Purreau C. N., Koopman M. B. H., Hendriks F. R., Evenberg D., van Muiswinkel W. B.: Modulation of the mitogenic PHA response of carp, *Cyprinus carpio* L., by extracellular products of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Biol. 1987, 31, Suppl. A, 133-143.
24. Sakai D. K.: Causative factor of *Aeromonas salmonicida* in salmonid furunculosis: extracellular protease. Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery 1977, 32, 61-89.
25. Sakai D. K.: Colliquative activity of purified protease for muscular tissue in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery 1978, 33, 55-64.
26. Sakai D. K.: Significance of extracellular protease for growth of a heterotrophic bacterium, *Aeromonas salmonicida*. Appl. Environ. Microbiol. 1985, 50, 1031-1037.
27. Salte R., Norberg K., Arnesen J. A., Ødegaard O. R., Eggset G.: Serine protease and glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase of *Aeromonas salmonicida* work concert in thrombus formation, in vitro the process is counteracted by plasma antithrombin and α_2 macroglobulin. J. Fish Dis. 1992, 15, 215-227.
28. Salte R., Norberg K., Ødegaard O. R., Arnesen J. A., Olli J. J.: Exoterin - induced consumptive coagulopathy in Atlantic salmon *Salmo salar* L.; inhibitory effect of exogenous antithrombin and α_2 -macroglobulin on *Aeromonas salmonicida*. 1993, 16, 425-435.
29. Shieh H. S.: Vaccination of Atlantic salmon against furunculosis with protease of virulent strain of *Aeromonas salmonicida*. Microbios Letts 1984, 25, 131-134.
30. Shieh H. S.: Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., against furunculosis with protease of an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Biol. 1985, 27, 97-101.
31. Tatner M. F.: Modified extracellular product antigens of *Aeromonas salmonicida* as potential vaccines for the control of furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 1991, 14, 395-400.
32. Whitby P. W., Delany S. G., Coleman G., Munro A. L. S.: The occurrence of a 70 kDa serine protease gene in typical and atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 1992, 15, 529-535.
33. Zuo X., Woo P. T. K.: In vitro secretion of metallo-protease (200 kDa) by the pathogenic piscine haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* Katz, and stimulation of protease production by collagen. J. Fish. Dis. 1998, 21, 249-255.