

Charakterystyka immunogenności *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* u pstrąga tęczowego^{*})

LESZEK GUZ, KYEONG JUN LEE*, KONRAD DĄBROWSKI*, VIVIANE VERLHAC**

Zakład Chorób Ryb i Biologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

*School of Natural Resources, Ohio State University, USA

**Société Chimique Roche, CRNA, Saint-Louis, France

Guz L., Lee K. J., Dąbrowski K., Verlhac V.

Characterizing the immune response of rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* antigens

Summary

The study examined a strain of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* (*A. salm*) isolated from an epizootic of diseased Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), and strains of *A. hydrophila* (7) and *A. sobria* (1) isolated from MAI (motile aeromonads infection) diseased carp.

The UPGMA statistical analysis of *A. salm* (1), *A. hydrophila* (7) and *A. sobria* (1) cell proteins (SDS-PAGE) was performed. Applying UPGMA clustering produced a dendrogram in which one cluster of *A. salmonicida* was distinguished.

Rainbow trout - *Oncorhynchus mykiss* (golden variety) - responded to intraperitoneal injections of formalin which killed *A. salmonicida* spp. *salmonicida* (*A. salm*) by producing specific antibodies. The fish were immunized with whole formalin-killed *A. salm* cells with oil adjuvant (group 1), and whole formalin-killed *A. salm* cells without adjuvant (group 2). The control groups were injected with adjuvant (group 3), and with PBS (group 4). The specific immunoglobulin level of 0.83 ($s = 0.14$; $n = 5$) in group 1 was significantly higher ($p = 0.001$) than the level of 0.44 ($s = 0.23$; $n = 5$) in group 2.

ELISA and Western blotting analysis revealed that the immune serum produced against *A. salm* reacted with seven *A. hydrophila* strains, whereas no reaction to *A. sobria* was detected. Each of the five antisera from rainbow trout immunized with *A. salm* (group 1) was allowed to react with *A. salmonicida* and 7 strains of *A. hydrophila*. The *A. hydrophila* strains (*A.h.-F2/94*, *A.h.-F17*, *A.h.-F12*, *A.h.-F8*, *A.h.-2s*, *A.h.-F6/95*, *A.h.-F3/94*) cross reacted with golden trout-anti-*A. salm* (GtAs), although these reactions were less significant than those with *A. salm*.

The Western blots show that the GtAs reacted with several bands from *A. hydrophila* and *A. sobria*. Normal fish antisera did not react with *A. salmonicida*, *A. hydrophila* and *A. sobria*. The authors found that the most important antigens on the surface of *A. salmonicida* spp. *salmonicida* were 68.3 kDa, 33.9 kDa, 21.5 kDa and 12.7 kDa proteins. The most common antigens responsible for the cross-reactions seemed to be 68.3 kDa and 21.5 kDa proteins (appearing in all studied strains).

The results of the study indicate that there are cross-reacting epitopes on *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* and both *A. hydrophila* and *A. sobria*.

Keywords: fish, *Aeromonas*, immune response

Wrzodzienica jest bakteryjną chorobą ryb łososiowatych wywoływaną przez *A. salmonicida* (25). Choroba ta powoduje znaczne straty ekonomiczne w gospodarstwach hodujących te ryby. Objawia się miejscowymi zmianami zapalnymi i martwiczymi powłok zewnętrznych i mięśni. W warunkach hodowlanych może występować w formie ostrej (z masowymi śnięciami), podostrej lub przewlekłej. Ostra forma choroby występuje zarówno u młodych, jak i starszych ryb. Charakteryzuje się pociemnieniem skóry oraz wybro-

czynami u podstawy płetw, w jamie gębowej i narządach wewnętrznych, gdzie mogą wystąpić ogniska martwicy. Przewlekła forma choroby występuje zwykle u starszych ryb i charakteryzuje się występowaniem różnej wielkości wrzodów na powierzchni ciała. W jamie ciała występują ogniska zapalne i wybroczyny w narządach (21). Chorobę wywołuje Gram-ujemna pałeczka należąca do rodziny *Aeromonadaceae*, rodzaju *Aeromonas* i gatunku *A. salmonicida*. Bakteria ta nie posiada zdolności ruchu i rośnie dobrze na agarze tryptozowo-sojowym w warunkach tlenowych w temperaturze 18-30°C. Wytwarza tyrozyne, z której powstaje melanina. Jest to cecha charakterystyczna tej bakterii.

^{*}) Badania sponsorowane przez School of Natural Resources, Ohio State University, Columbus, USA oraz częściowo w ramach grantu KBN nr 5 P06K 013 19.

Badania prowadzące do opracowania skutecznej i ekonomicznie opłacalnej szczepionki przeciwko wrzodzeniu opisywało wielu autorów (7, 10, 18, 19, 27). Stosowane dawniej szczepionki nie przynosiły zazwyczaj oczekiwanych wyników (6, 16). Dootrzewnowe zastosowanie adiuwantów olejowych dało dużo wyższą i dłużej trwającą protekcję poszczepienną. Adiuwanty te dają jednak dość znaczny miejscowy efekt poszczepienny (side effect) (24, 28).

Celem badań było określenie immunogennych właściwości *A. salmonicida ssp. salmonicida* (bakterii wyizolowanej od chorego na wrzodzenie gólca wędrownego, *Salvelinus alpinus*) u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Porównano również reaktywność surowicy odpornościowej anti-*A. salmonicida ssp. salmonicida* (GtAs) z antygenami komórek *A. salmonicida ssp. salmonicida* oraz *A. hydrophila* i *A. sobria*, bakteriami wyizolowanymi od karpki chorych na chorobę wrzodową (MAI, motile aeromonads infection).

Materiał i metody

Szczep *A. salmonicida ssp. salmonicida* (*A. salm.*) wyizolowany od chorego na wrzodzenie gólca wędrownego (*Salvelinus alpinus*) otrzymano od dr. Clifa Starlipersa (National Fish Health Res., West Virginia, USA). Szczepy *A. hydrophila* oraz *A. sobria* wyizolowano z klinicznych postaci MAI karpki (*Cyprinus carpio*). Bakterie te wywoływały powstawanie wrzodów u pstrągów tęczowych po zażeniu podskórnym. Bakterie hodowano na agarze tryptozowo-sojowym i namnażano w zależności od potrzeb na bulionie tryptozowo-sojowym (TSB) oraz przetrzymywano w 20% glicerolu, w temp. -70°C . Właściwości biochemiczne bakterii określano na podstawie standardowych metod biochemicznych oraz testu API 20E. Profil biochemiczny używanego testu obejmował oznaczenia na: ONPG – β galaktozydazę, ADH – dehydrolazę argininy, LDC – dekarboksylazę lizyny, ODC – dekarboksylazę ornityny, H_2S – wytwarzanie siarkowodoru, URE – mocznika, TDA – dazaminazę tryptofanu, IND – wytwarzanie indolu, VP – wytwarzanie acetoiny, GEL – żelatynazy, GLU – fermentację glukozy, MAN – mannitolu, INO – inozytolu, SOR – sorbitolu, RHA – ramnozy, SAC – sacharozy, MEL – melobiozy, AMY – amygdaliny, ARA – arabinozy, OX – wytwarzanie oksydazy.

Eksperymentalne szczepienia ryb przeprowadzono w School of Natural Resources (SNR), Ohio State University, USA. Do doświadczenia użyto pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*, odmiana złota) o średniej masie ciała 42,8 g. Ryby trzymano w wodzie o temperaturze ok. $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ i poziomie tlenu 8 mg l^{-1} oraz karmiono paszą przygotowaną zgodnie z procedurą opracowaną w School of Natural Resources.

W celu przygotowania szczepionki *A. salmonicida* hodowano w bulionie tryptozowo-sojowym, w temperaturze 18°C , przez 48 godz. z ciągłym mieszaniem (180 RPM). Gęstość bakterii doprowadzono do $\text{OD}_{600} = 1,2$, a następnie płukano dwukrotnie w PBS i dodano 1% formaliny. Tak przygotowaną zawiesinę bakterii przechowywano w 4°C do momentu użycia. Immunizację wykonano w czterech gru-

pach ryb: grupę 1 – stanowiły ryby ($n = 5$), którym podano dootrzewnowo (IP) szczepionkę z adiuwantem olejowym (AO); grupę 2 – stanowiły ryby ($n = 5$), którym podano IP szczepionkę bez adiuwantu; grupę 3 – stanowiły ryby ($n = 6$), którym podano 0,1 ml AO; grupę 4 – stanowiły ryby ($n = 6$), którym podano 0,1 ml PBS. Przed immunizacją ryby były poddane działaniu środka anestetycznego MS-222 (Sigma) zgodnie z zaleceniem producenta. Rybom podawano dootrzewnowo $1,2 \times 10^7$ bakterii na 10 g masy ciała. Grupom kontrolnym podawano adiuwant i PBS. Krew od ryb pobierano po 9 tygodniach od immunizacji, a otrzymaną surowicę przetrzymywano w temp. -70°C aż do użycia.

Bakterie użyte do elektroforezy (SDS-PAGE) odwirowano z 1,5 ml hodowli bakteryjnej ($\text{OD}_{540} = 1,2$), trzykrotnie płukano w PBS, a następnie zamrożono w -70°C . Przed użyciem dodano 50 μl buforu lizującego (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 10% 2-merkaptotanol) i po rozpipetowaniu inkubowano w 100°C przez 5 min. Elektroforezę wykonywano wg metody Laemmli (17). Żele barwiono w roztworze Coomassie Blue R-250 (0,125% Coomassie Blue R-250; 50% metanol; 10% kwas octowy) i odbarwiano w roztworze metanol/kwas octowy/woda (30%/10%/60%). Żele suszono w ramowej suszarce DRY-OUT (TE Kucharczyk). Immunobloting wykonano zgodnie z instrukcją Life Technologies. Transfer białek rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym wykonano na membranę PVDF (BIO-RAD). Powstałe kompleksy antygen-przeciwciała uwidoczniono za pomocą monoklonalnych przeciwciał (mAb-1:14 otrzymanych od dr. Normana Millera z University of Mississippi Medical Center, Jackson, MS) przeciwko IgM pstrąga tęczowego oraz skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą swoistych przeciwciał króliczych przeciwko immunoglobulinom mysim (DAKO, D-0314). Jako substratu dla alkalicznej fosfatazy użyto 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforanu (BCIP) i błękitu nitrotetrazolowego (NBT) (Life Technologies) w buforze (0,1 M Tris, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl_2).

Do analizy elektroforegramów użyto Gel Doc 2000 Gel Documentation System (BIO-RAD).

Test ELISA wykonano wg metody Lund i wsp. (19) z modyfikacjami własnymi. Do opłaszczania płytek ELISA używano zawiesiny bakterii *A. salmonicida ssp. salmonicida*, *A. hydrophila* i *A. sobria* ($\text{OD}_{540} = 0,8$) poddanych sonikacji (100 W, 5×15 s). Surowicę pstrągów rozcieńczano 1 : 200, a przeciwciała mAb-1:14 rozcieńczano 1 : 250. Powstałe kompleksy antygen-przeciwciała uwidacziano za pomocą sprzęgniętych z alkaliczną fosfatazą (AP) króliczych przeciwciał przeciwko Ig mysim (DAKO, D-0314) i soli disodowej fosforanu p-nitrofenylu jako substratu dla AP.

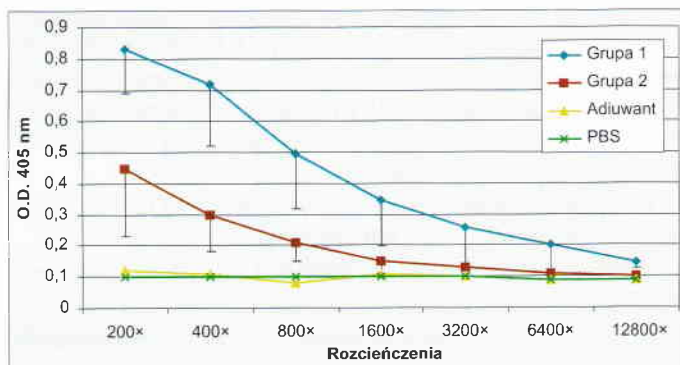
Pokrewieństwo badanych szczepów bakteryjnych badano na podstawie liczby i masy cząsteczkowej białek komórek bakteryjnych uzyskanych po elektroforetycznym rozdzielaniu w żelach poliakrylamidowych, używając metody par skojarzeniowych (UPGMA) przy zastosowaniu metody łączenia sąsiedztwa (neighbour joining metod). Badania te wykonano przy użyciu programu Quantity One 1-D Image Analysis Software (BIO-RAD).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z uwzględnieniem testu Student-Newman-Keuls przy pomocy programu InStat (Sigma).

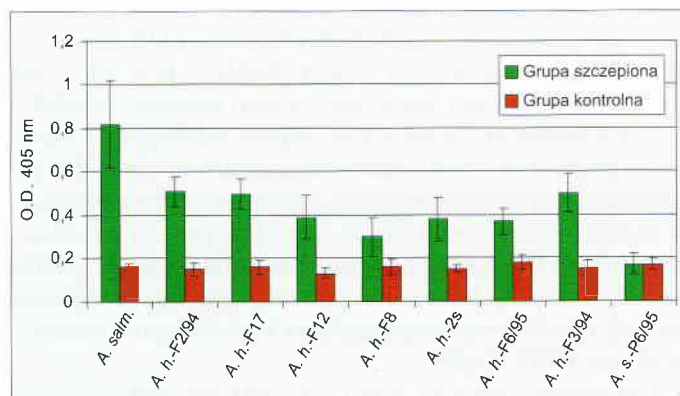
Wyniki i omówienie

Czynnikiem etiologicznym wrzodzenia ryb łososiowatych jest bakteria *A. salmonicida*. Występuje pięć podgatunków tej bakterii: typowy podgatunek – *salmonicida* oraz atypowe podgatunki – *achromogenes*, *masoucida*, *smithia* i *pectinolytica*. Atypowe podgatunki *A. salmonicida* wywołują znaczne straty w hodowlach łososi atlantyckich w Islandii, jak również są czynnikiem etiologicznym *erythrodermatitis* karpi i choroby wrzodowej karasi. Bakterię, która wywołuje typową wrzodnicę ryb łososiowatych jest *A. salmonicida ssp. salmonicida*. W niniejszej pracy bakteria, która posłużyła do przygotowania szczepionki, izolowana była od golca wędrownego i zidentyfikowana biochemicznie jako *A. salmonicida ssp. salmonicida*. W teście API 20E próby ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H₂S, URE, TDA, IND, VP, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA były negatywne, natomiast próby GEL, GLU, MAN, OX dały wyniki dodatnie. Odczytany z testu kod identyfikacyjny wynosił 0006104. Bakteria ta produkowała również brązowy barwnik w czasie namnażania w podłożu wzrostowym.

Badania nad uzyskaniem skutecznej szczepionki przeciwko wrzodzeniu ryb łososiowatych prowadzone są od dawna i dają pozytywne wyniki (7, 18, 20, 23). Szczepionki z adiuwantem olejowym (AO) stymulują u ryb znacznie lepszą ochronę przed zakażeniem i indukują wyższy poziom swoistych przeciwciał w porównaniu ze szczepionkami bez AO (13, 23,



Ryc. 1. Poziom swoistych przeciwciał po szczepieniu ryb
Objaśnienia podano w dziale Materiał i metody



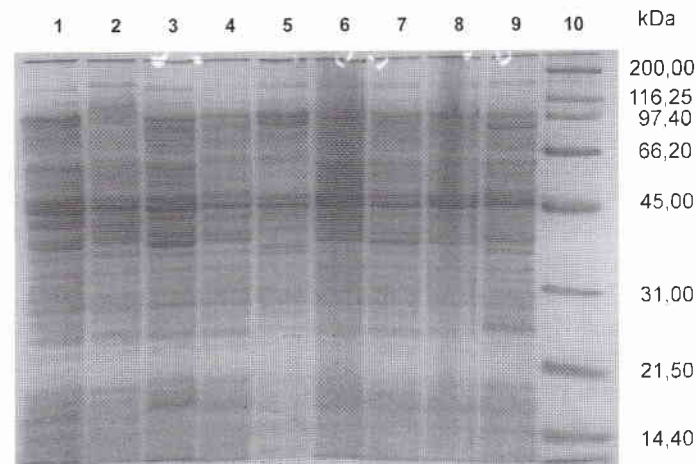
Ryc. 2. Reaktywność przeciwciał anty-*A. salm.* w stosunku do badanych szczepów bakteryjnych z rodzaju *Aeromonas*

24). Znalazło to potwierdzenie również w niniejszych badaniach, w których testowano dwie szczepionki przygotowane na bazie komórek bakteryjnych (bez supernatantu) zabitych formaliną. Po 9 tygodniach od szczepienia, surowice ryb grupy I (bakterie inaktywowane formaliną z adiuwantem olejowym) i ryb grupy II (bakterie zabite formaliną bez adiuwantu olejowego) wykazywały wysoki poziom swoistych przeciwciał (ryc. 1). Wyższy poziom przeciwciał stwierdzono w grupie I ($O.D._{405} = 0,83$; $s = 0,14$; $n = 5$) niż w grupie II ($O.D._{405} = 0,44$; $s = 0,23$; $n = 5$), a różnica ta była statystycznie istotna ($p \leq 0,001$). Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,001$) wystąpiły również pomiędzy grupami I a III ($O.D._{405} = 0,12$; $s = 0,01$; $n = 6$) oraz I a IV ($O.D._{405} = 0,10$; $s = 0,01$; $n = 6$), jak również pomiędzy II a III ($p \leq 0,01$) oraz II a IV ($p \leq 0,01$).

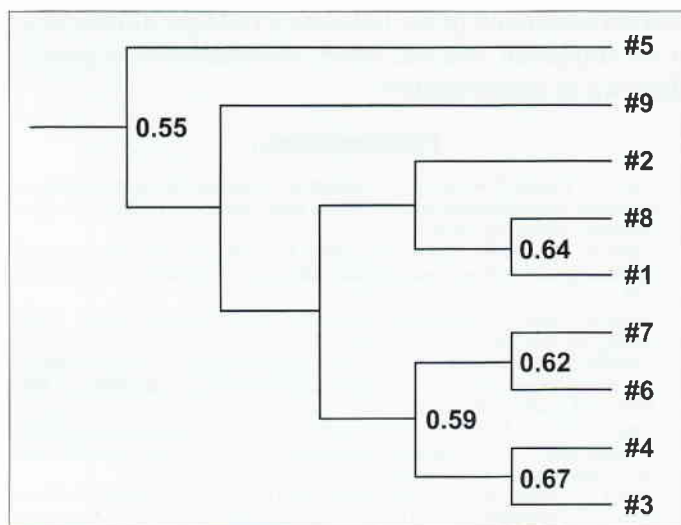
W niniejszych badaniach określono również reakcje krzyżowe pomiędzy *A. salmonicida ssp. salmonicida* oraz siedmioma szczepami *A. hydrophila* i jednym szczepem *A. sobria*. Surowice pochodzące od pstrągów grupy I wykazywały istotnie wyższe wartości ($p \leq 0,001$) w stosunku do antygenów *A. salmonicida ssp. salmonicida* niż do antygenów uzyskanych od szczepów *A. hydrophila* (*A. h.-F2/94*, *A. h.-F17*, *A. h.-F12*, *A. h.-F8*, *A. h.-2s*, *A. h.-F6/95*, *A. h.-F3/94*) i *A. sobria* (*A. s.-P6/95*). Natomiast surowice pochodzące od ryb grupy IV cechowały się istotnie niższymi wartościami przy $p \leq 0,001$ (z wyjątkiem *A. s.-P6/95*; $p = 0,05$) w porównaniu z surowicami ryb grupy I (ryc. 2).

Na podstawie rozdzielów elektroforetycznych białek komórek bakteryjnych (ryc. 3) przeprowadzono analizę różnicowania badanych szczepów. W uformowanym metodą UPGMA dendrogramie wyraźnie wyróżnia się klastery, który obejmuje szczep *A. salmonicida ssp. salmonicida* (#5) (ryc. 4).

W badaniach Gunnlaugsdottir i wsp. (9) po szczepieniu łososi przeciwko chorobie wywoływanej przez *A. salmonicida ssp. achromogenes* nie wykazywano ochronnego efektu przeciwko typowej wrzodnicy.



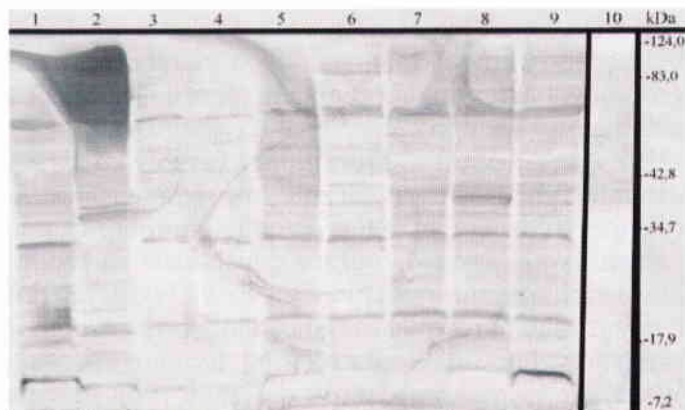
Ryc. 3. Elektroforetyczne (SDS-PAGE) profile białkowe badanych szczepów bakteryjnych. *A. h.-F2/94* (1), *A. h.-F17* (2), *A. h.-F12* (3), *A. h.-F8/95* (4), *A. salm.* (5), *A. h.-2s* (6), *A. h.-F6/95* (7), *A. h.-F3/94* (8), *A. s.-P6/95* (9)



Ryc. 4. Dendrogram badanych szczepów *Aeromonas* skonstruowany przy użyciu programu Quantity One 1-D z opcją UPGMA, na podstawie liczby i masy cząsteczkowej uzyskanych po rozdzielaniu białek komórek bakteryjnych w żelach poliakrylamidowych (SDS-PAGE)

Brak jest jednak dokładniejszych badań dotyczących porównania struktur antygenowych różnych gatunków bakterii z rodziny *Aeromonadaceae*. Dotychczasowe prace koncentrują się głównie nad badaniem struktur powierzchniowych w obrębie jednego gatunku (4, 5, 7, 15, 26). Midtlyng i wsp. (24) obserwowali zależność pomiędzy poziomem swoistych przeciwciał przeciwko powierzchniowemu białku-A *A. salmonicida* oraz odpornością na zakażenie w teście „challenge”. Inni autorzy opisują wysoki poziom swoistych przeciwciał poszczepiennych u świeżo zarażonych łososi w porównaniu z niskimi poziomami u ryb chorych przewlekłe. W pierwszym przypadku przeciwciała reagowały zarówno z powierzchniowym białkiem-A, jak i o-polisacharydowym składnikiem LPS, natomiast w przypadku choroby przewlekłej reagowały głównie z białkiem A (22). Hoel i wsp. (11) znajdowali również reakcje krzyżowe pomiędzy antygenami *A. salmonicida* i *Vibrio salmonicida*. W badaniach tych za główne antygeny *A. salmonicida* uznano białka o m.c. 50, 30 i 14 kDa. W przeprowadzonych badaniach profil antygenowy *A. salm.* zawierał 10 białek o masach cząsteczkowych: 68,8 kDa, 60,9 kDa, 53,7 kDa, 49,1 kDa, 42,8 kDa, 38,4 kDa, 36,7 kDa, 33,5 kDa, 21,5 kDa i 12,5 kDa. Immunogenność powierzchniowych antygenów komórek bakterii *A. salmonicida* była również badana przez Charta i wsp. (1, 2) oraz Lunda i wsp. (19). W badaniach na łososiach atlantyckich wykazano (19), że powierzchniowe białko-A (A-layer protein) oraz LPS są najbardziej reaktywnymi cząsteczkami bakterii *A. salmonicida*. Inni badacze odnotowali, że zarówno białka warstwy A, jak i LPS są strukturalnie i immunologicznie homogenne (2). Hädger i wsp. (12) również wykazali strukturalną homogenność LPS otrzymanego z typowych i atypowych szczepów *A. salmonicida*.

U bakterii *A. salmonicida* identyfikowano cztery grupy białek błony zewnętrznej lub ich geny: 1 – białka IROMPs (iron-regulated OMPs) (3, 26), 2 – poriny maltozozależne (maltose inducible porin) (5), 3 – gen *exeD* kodujący białko odpowiedzialne za zewnątrzkomórkową sekrecję (15), 4 – białko Omp A, odpowiedzialne za stabilizację struktury błony zewnętrznej i aktywność poryn (4). Wyniki badań Ellisa (7) sugerują, że przeciwciała anty-LPS i anty-IROMPs są odpowiedzialne za zwiększoną odporność ryb na zakażenie. W badaniach Garduno i wsp. (8) wirulentne szczepy *A. salmonicida* mające warstwę S (S-layer, S+) wykazywały zdolność do przylegania, wnikania i przeżywania wewnątrz makrofagów. Bakterie S+ wykazywały znacznie większą zdolność przylegania do komórek w porównaniu z bakteriami S-. Ishiguro i wsp., (14) udowodnili, że utrata przez bakterie warstwy S powoduje pozbawienie zdolności do zakażenia. Powierzchniowe antygeny *A. salmonicida*, obok białek zewnątrzkomórkowych, decydują o immunogenności i antygenowości poszczególnych gatunków bakterii. W niniejszych badaniach określono odpowiedź immunologiczną, po podaniu szczepionki, wykorzystując metody immunologiczne. W celu identyfikacji komórkowych antygenów, które stymulują wytwarzanie przeciwciał użyto metody immunoblotingu (Western blotting) (ryc. 5). Otrzymane wyniki wykazały wysoką reaktywność (powstałych po immunizacji ryb bakteriami *A. salmonicida ssp. salmonicida*) przeciwciał anty-*A. salm.* z powierzchniowymi antygenami homogennego szczepu *A. salmonicida* oraz ze szczepami *A. hydrophila* i *A. sobria*. Normalna surowica pstrągów nie dawała wyraźnej reakcji z badanymi szczepami, natomiast wszystkie szczepy posiadały wspólne główne antygeny, których masy cząsteczkowe wynosiły odpowiednio 68,8 kDa i 21,5 kDa. Wszystkie badane szczepy, z wyjątkiem *A. h.-F17*, posiadały antygen o m.c. 33,5 kDa. Ponadto, badane szczepy z wyjątkiem *A. h.-F12* i *A. h.-F8/95* posiadały antygen o m.c. 36,7 kDa, jak również szczepy z wyjątkiem *A. h.-F2/94* i *A. h.-2s* posiadały antygen o m.c.



Ryc.5. Reakcje surowicy pstrąga anty-*A. salm.* ze szczepami: *A. h.-F2/94* (1), *A. h.-F17* (2), *A. h.-F12* (3), *A. h.-F8/95* (4), *A. salm.* (5), *A. h.-2s* (6), *A. h.-F6/95* (7), *A. h.-F3/94* (8), *A. s.-P6/95* (9)

Tab. 1. Reakcje białek badanych szczepów bakteryjnych z surowicą pstrąga anty-*A. salm.*

Objaśnienie: czcionką pogrubioną zaznaczono antygeny, w stosunku do których wystąpiły swoiste reakcje immunologiczne u wszystkich badanych szczepów

Antygeny (kDa)	<i>A. h.-F2/94</i>	<i>A. h.-F17</i>	<i>A. h.-F12</i>	<i>A. h.-F8/95</i>	<i>A. salm.</i>	<i>A. h.-2s</i>	<i>A. h.-F6/95</i>	<i>A. h.-F3/94</i>	<i>A. s.-P6/95</i>
107,7							+		
104,9								+	+
99,0						+			
87,1						+			
85,7								+	+
78,2		+						+	+
74,1								+	+
68,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60,9					+				
53,7			+		+	+			
49,1			+		+			+	+
44,4			+				+	+	+
42,8					+	+	+	+	+
41,1						+		+	+
40,3	+						+		+
39,0	+							+	
38,4		+			+	+	+	+	+
36,7	+	+			+	+	+	+	+
33,5	+		+	+	+	+	+	+	+
26,4	+	+							
21,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,5	+							+	+
16,0									+
12,5		+	+	+	+		+	+	+
11,3		+	+	+					

12,5 kDa. Obok białek głównych występowały także białka dodatkowe, różniące się u poszczególnych szczepów bakteryjnych. Białka te określają specyfikę antygenową danego szczepu bakteryjnego (tab. 1).

Stosowane obecnie szczepionki przeciwko wrzodzeniu ryb łososiowatych znacznie ograniczają straty ekonomiczne wywołane przez tę chorobę. Ciągłe jednak trwają prace dotyczące udoskonalenia produkowanych obecnie szczepionek. Niewiele danych dotyczy jednak porównawczego badania powierzchniowych antygenów bakterii z rodziny *Aeromonadaceae*. Wskazuje to na konieczność dalszego prowadzenia badań w tym kierunku. Badania te są szczególnie ważne dla opracowania skuteczniejszych szczepionek przeciwko wrzodzeniu ryb łososiowatych, *erythrodermatitis* oraz chorobie wrzodowej i posocznicy karpi, cho-

rób wywołanych przez bakterie z rodzaju *Aeromonas*, powodujących znaczne straty ekonomiczne w gospodarstwach hodowlanych.

Piśmiennictwo

- Chart H., Person T. W., Trust T. J.: Detection of fish specific antibody using an inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (inhibition ELISA). J. Immun. Methods 1984 a, 68, 19-24.
- Chart H., Shaw D. H., Ishiguro E. E., Trust T. J.: Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide. J. Bact. 1984 b, 158, 16-22.
- Chart H., Trust T. J.: Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*. J. Bact. 1983, 156, 758-764.
- Costello G. M., Vipond R., McIntyre S.: *Aeromonas salmonicida* possesses two genes encoding homolog of the major outer membrane protein, OmpA. J. Bact. 1996, 178, 1623-1630.
- Dadsworth S. J., Bennett A. J., Coleman G.: Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the maltose-inducible porin gene of *Aeromonas salmonicida*. FEMS Microbiol Lett. 1993, 112, 191-198.
- Ellis A. E.: Current aspects of fish vaccination. Dis. Aquat. Org. 1988, 4, 159-164.
- Ellis A. E.: Immunization with bacterial antigens: furunculosis. Dev. Biol. Stand. 1997, 90, 107-116.
- Garduno R. A., Moore A. R., Olivier G., Lizama A. L., Garduno E., Kay W. W.: Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. Can. J. Microbiol. 2000, 46, 660-668.
- Gunmlaugsdottir B., Gudmundsdottir B. K.: Pathogenicity of atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon compared with protease production. J. Apl. Microbiol. 1997, 83, 542-551.
- Hastings T. A., Ellis A. E.: The humoral response of rainbow truto, *Salmo gairdneri* Richardson, and rabbits to *Aeromonas salmonicida* extracellular products. J. Fish Dis. 1988, 11, 147-160.
- Hoel K., Reitan L. J., Lillehaug A.: Immunological cross reactions between *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rabbit. Fish Shellfish Immun. 1998, 8, 171-182.
- Hädge D., Lachmann I., Wagner U., Drössler K.: Characterization of core-oligosaccharide and O-poly saccharide-specific monoclonal antibodies against *Aeromonas salmonicida* LPS binding to typical and atypical *Aeromonas salmonicida* isolates. Aquaculture 1997, 157, 157-171.
- Ingilav M., Arnesen J. A., Lund V., Eggset G.: Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichus minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 2000, 183, 31-44.
- Ishiguro E. E., Kay W. W., Ainsworth T., Chamberlain J. B., Austen R. A., Buckley J. T., Trust T. J.: Los of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. J. Bacteriol. 1981, 148, 333-340.
- Karlyshev A. V., MacIntyre S.: Cloning and study of the genetic organisation of the *exe* gene cluster of *Aeromonas salmonicida*. Gene 1995, 158, 77-82.
- Kennedy-Stoskopf S.: Immunology, [w:] Fish Medicine (Stoskopf M. K., wyd.), Saunders W. B., Philadelphia 1993, 149-159.
- Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 1970, 227, 680-685.
- Lillehaug A., Lunder T., Pöppel T. T.: Fidel testing of adjuvanted furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 1992, 15, 485-496.
- Lund V., Jørgensen T., Holm K. O., Eggset G.: Humoral immune response in Atlantic salmon, *Salmo salar*, to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 1991, 14, 443-454.
- Lund V., Arnesen J. A., Eggset G.: Vaccine development for atypical furunculosis in spotted wolffish *Anarhichus minor* O.: Comparison of efficacy of vaccines containing different strains of atypical *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 2002, 204, 33-34.
- MacCarthy D. H., Roberts R. J.: Furunculosis of fish - the present state of our knowledge, [w:] Advances In Aquatic Microbiology, Wyd. Drop M. R., Janasch H. W., Academic Press, London 1980, 293-341.
- Magnadottir B., Gudmundsdottir S., Gudmundsdottir B. K.: Study of the humoral response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), naturally infected with *Aeromonas salmonicida* ssp. achromogenes. Vet. Immunol. Immunopathol. 1995, 49, 127-142.
- Midtlyng P. J.: A Fidel study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon against furunculosis. Fish Shellfish Immun. 1996, 6, 553-565.
- Midtlyng P. J., Reitan L. J., Spellberg L.: Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. Fish Shellfish Immun. 1996, 6, 335-350.
- Munro A., Hastings T. S.: Furunculosis, [w:] Bacterial Diseases in Fish (English V., Roberts R. J., Bromage N.R., red.), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993, 122-142.
- Neelam B., Robinson R. A., Price N. C., Stevens L.: The effect of iron limitation on the growth of *Aeromonas salmonicida*. Microbios 1993, 74, 59-67.
- Olivier G., Evelyn T. P. T., Lallier R.: Immunity to *Aeromonas salmonicida* (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. Develop. Comp. Immunol. 1985, 9, 419-432.
- Press C. M., Lillehaug A.: Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. Br. Vet. J. 1995, 151, 45-69.

Adres autora: dr Leszek Guz, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: guzle@agros.ar.lublin.pl