

AUTOSZCZEPIONKI PRZECIWKO JERSINIOZIE I WRZODZIENICY JAKO ALTERNATYWNA METODA SWOISTEJ IMMUNOPROFILAKTYKI TYCH CHORÓB.

Alicja Kosińska, Agnieszka Pękala

*Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy, Zakład
Chorób Ryb, Puławy.*

Wstęp

Wzrastająca intensyfikacja produkcji ryb, między innymi poprzez stosowanie zbyt gęstych obsad oraz narastające skażenie środowiska, w znacznym stopniu sprzyjają rozwojowi wielu chorób zakaźnych. Ponadto, ryby hodowane są zwykle w monokulturach, przez co zakłócona jest naturalna równowaga biologiczna w środowisku wodnym. Pojawienie się określonego czynnika chorobotwórczego w obiekcie, gdzie hodowane są ryby wrażliwe na ten czynnik, powoduje idealne warunki do rozwoju choroby, która często ma gwałtowny przebieg. W takiej sytuacji, nawet zastosowanie antybiotyku (w przypadku choroby bakteryjnej), nie zawsze przynosi poprawę stanu zdrowia ryb, ponieważ leki te podawane są zwykle w paszy, a ryby chore przestają żerować. Ponadto, dobór odpowiedniego leku musi być poprzedzone diagnostyką laboratoryjną oraz badaniem leko-wrażliwości wyizolowanych drobnoustrojów. Badania te są czasochłonne, natomiast leczenie ryb powinno być podejmowane możliwie jak najwcześniej, po wystąpieniu pierwszych symptomów choroby. Zatem kluczową rolę w zapobieganiu bakteryjnym chorobom ryb powinna odgrywać profilaktyka, a szczególnie immunoprofilaktyka, polegająca na stosowaniu preparatów zwiększających odporność nieswoistą i/lub swoistą u ryb. W gospodarstwach rybackich, w których określona choroba bakteryjna pojawia się systematycznie i może przynosić duże straty, stosowanie szczepionek stanowi jeden z najważniejszych elementów postępowania profilaktycznego.

Szczepionki przeciwko bakteryjnym chorobom ryb

Rozwój badań nad szczepionkami dla ryb ma długą historię. Pierwsze próby nad opracowaniem szczepionki przeciwko wrzodzienicy podjęto już w pierwszej połowie ubiegłego stulecia. Od tego czasu opracowano szczepionki przeciwko większości znanych bakteryjnych patogenów ryb (Austin i Austin, 2007). Wieloletnie prace badawcze doprowadziły do uzyskania w miarę skutecznych szczepionek przeciwko chorobie Hitra, edwardsiellozie, jersiniozie, wibriozie i wrzodzienicy, które są obecnie produkowane na skalę przemysłową. W Polsce, dopuszczone są do stosowania komercyjne szczepionki przeciwko jersiniozie i wrzodzienicy. Wśród bakteryjnych chorób ryb, te dwie jednostki stanowią obecnie najpoważniejszy problem w hodowli ryb łososiowatych w naszym kraju. Szczepionki te zawierają, jako czynnik immunogeny, jeden lub dwa inaktywowane szczepy bakteryjne (bakteryjny).

Dotyychczasowe badania wykazały, że większość szczepionek przeciwko różnym

bakteryjnym chorobom ryb, zawierających bakteryny, wykazuje największą skuteczność po zastosowaniu ich w kąpieli lub drogą iniekcji dootrzewnowej (wg danych Austin i Austin, 2007). Wyjątek stanowią szczepionki przeciwko wrzodzienicy lub innych chorób wywoływanych przez bakterie *Aeromonas salmonicida*. Pomimo bardzo licznych badań poświęconych opracowaniu skutecznej szczepionki przeciwko wrzodzienicy, dotychczas nie ustalono precyzyjnie odpowiedniego składu antygenowego tych szczepionek, który by zapewniał jej powtarzalną, wysoką skuteczność. W badaniach wykorzystywano jako antygen całe, inaktywowane komórki, ich lizaty bakterie atenuowane, oczyszczone elementy strukturalne komórek, produkty wydzielania zewnętrznego oraz różne kombinacje tych elementów. W większości uzyskiwano wyniki słabe lub niejednoznaczne, zależnie od sposobu podania szczepionki, temperatury wody, gatunku ryb, itp.

Do produkcji szczepionek komercyjnych wykorzystuje się najczęściej klasyczne, dobrze poznane pod względem morfologicznym, biochemicznym, antygenowym oraz chorobotwórczym szczepu bakteryjne. Problemy przy stosowaniu tych szczepionek pojawiają się wówczas, kiedy określona choroba wywoływana jest przez mikroorganizmy o zmienionym profilu fenotypowym lub/i genotypowym. Zmienność różnych mikroorganizmów, w tym także bakterii, jest powszechnie znana; może być ona wynikiem rozpowszechnienia bakteriofagów, zróżnicowanych warunków środowiskowych, potencjału obronnego żywiciela itp. Długotrwałe stosowanie szczepionek, zawierających, jako antygen, określony szczep bakterii, może prowadzić do pojawiania się w danej populacji zwierząt (w tym także ryb), szczepów o innej strukturze antygenowej. Mogą to być np. inne serotypy. W wyniku zmienności, określony gatunek bakterii, może wykazywać mniejszą lub większą zjadliwość lub/i wrażliwość na czynniki odpornościowe żywiciela. Zmiana profilu właściwości chorobotwórczych określonego patogenu może prowadzić do powstania innego obrazu klinicznego infekcji, co obserwuje się coraz częściej w hodowli ryb.

Produkowane na skalę przemysłową szczepionki przeciwko jersiniozie zawierają, jako antygen, inaktywowany szczep *Yersinia ruckerii*, (typ I, szczep Hagermana.), który jest uważany jako patogenny, zaliczony wcześniej do serowaru I, a obecnie do serotypu O1 (Bullock i Anderson, 1984; Davies, 1990). Jednak do serotypu O1 zostały włączone także szczepy typu (serowaru) III, w obrębie którego występują zarówno izolaty patogene jak też niepatogene. Zróżnicowanie dotyczące zjadliwości izolatów wykazano także w obrębie serowaru II (obecnie serotyp O2) (Flett, 1989). Ponadto, pojawiają się nowe, różne od szczepu Hagermana, biotypy *Y.ruckeri*. Są one rozpowszechnione w wielu krajach Europy, między innymi w Niemczech, Hiszpanii i w Polsce (Klein i wsp., 1994; Kozińska i Pękała, 2004; Fouz i wsp., 2006; Pękała, 2008;). Udokumentowano przypadki izolacji nowego biotypu *Yersinia ruckeri* w Anglii, które bardzo słabo reagowały z surowicami dla serowarów I i II. (Austin i wsp., 2003). Na uwagę zasługuje fakt, iż nowe biotypy szczepów *Y.ruckeri* izolowane w Anglii i Hiszpanii pochodziły od ryb wcześniej szczepionych komercyjną szczepionką przeciwko jersiniozie.

Dostępne w handlu szczepionki przeciwko wrzodzienicy (Aquaac FuroVac i AquaVac FNM^{PLUS} firmy Schering) zawierają całe, inaktywowane komórki *A.salmonicida*, a docelowym gatunkiem ryb, dla których są one przeznaczone jest łosoś atlantycki, na którym testowano skuteczność tych preparatów.

Przeprowadzone w Irlandii badania 239 szczepów *A.salmonicida* pochodzących od

różnych gatunków ryb z różnych obszarów geograficznych na całym świecie wykazały ich bardzo duże zróżnicowanie pod względem właściwości biochemicznych, serologicznych, genetycznych i patogennych

(Powell: www.aquamedia.org/aquainnovation/knowledgebase/afshowarticle). Autorzy tych badań uważają, że w obliczu wszechstronnej różnorodności tych bakterii, globalne zwalczanie wrzodzienicy wydaje się być mało prawdopodobne w najbliższych latach. Ze względu na specyfikę poszczególnych szczepów konieczne jest zatem zwalczanie indywidualne. Potwierdzeniem tych badań jest fakt, iż zawęża się też rynek produkowanych na skalę przemysłową szczepionek, nie tylko ze względu na ich wysoką cenę, ale także dlatego, iż wykazują one różną skuteczność, zależnie od gatunku ryb, ale także w różnych populacjach ryb jednego gatunku.

Autoszczepionki

Wobec pojawiających się trudności skutecznej profilaktyki przy użyciu szczepionek komercyjnych, wzrasta zainteresowanie stosowaniem autoszczepionek, nie tylko w ichtiopatologii, ale także w innych dziedzinach weterynarii. Problem ten dotyczy zasadniczo wszystkich gatunków zwierząt wrażliwych na infekcje mikroorganizmów występujących w wielu formach antygenowych lub też w przypadkach chorób o złożonej etiologii. Rynek polski ma bardzo ograniczony wybór szczepionek komercyjnych przeciwko określonej chorobie bakteryjnej ryb, co powoduje, że w miejsce szczepionkowych szczepów bakteryjnych, pojawiają się coraz częściej szczepy o zmienionych właściwościach. Zmienność bakterii umożliwia im ucieczkę przed mechanizmami obronnymi gospodarza i/lub kolonizację różnych środowisk

(http://wiki.biol.uw.edu.pl/w/Molekularne_podstawy_bakteryjnej_patogenezy/Opracowania)

Autoszczepionki przygotowywane są na potrzeby konkretnego obiektu hodowli ryb, na bazie szczepów bakteryjnych izolowanych z tego obiektu. Oczywiście, jeżeli istnieje potrzeba powtarzania zabiegu na tej samej lub nowych populacjach ryb w danym obiekcie, nie można poprzestać na szczepach raz wyizolowanych. Konieczne jest monitorowanie obiektu, pod kątem możliwości pojawiania się szczepów o zmienionym profilu biochemicznym, enzymatycznym lub/i antygenowym, szczególnie wówczas, kiedy zaobserwowany zostanie spadek skuteczności autoszczepionki.

Zadawalająca skuteczność autoszczepionek jest udokumentowana wieloma badaniami eksperymentalnymi, prowadzonymi w wielu krajach na całym świecie. W badaniach eksperymentalnych, prowadzonych w warunkach laboratoryjnych jak i terenowych, wykorzystywane były najczęściej szczepy izolowane z obiektu, w którym prowadzono następnie próby dotyczące skuteczności szczepionek przygotowanych w laboratorium. Jednak pomimo dobrych, a nawet bardzo dobrych wyników, niewiele z nich znalazło zastosowanie na szerszą skalę, najprawdopodobniej z powodu niewielkiej skuteczności tych preparatów stosowanych w innych populacjach ryb. Prowadzono też szereg badań porównawczych skuteczności szczepionek komercyjnych i autoszczepionek. Dla przykładu, komercyjna szczepionka przeciwko jersiniozie (zawierająca antygeny szczepu *Y.ruckeri* - typ Hagermana), zastosowana w immersji, wykazywała wysoką skuteczność po zakażeniu pstrągów tęczowych homologicznym szczepem Hagermana, natomiast znacznie niższą skuteczność stwierdzono w grupie ryb zakażonych świeżym izolatem należącym do

innego biotypu (względny procent przeżywalności – RPS wynosił odpowiednio 95% i 47%). Przeciwnie, po immersyjnej immunizacji pstrągów tęczowych autoszczepionką zawierającą antygeny nowego biotypu *Y.ruckeri*, RPS wynosił zaledwie 32% (w grupie ryb zakażonych szczepem Hagermana) i 76% (w grupie ryb zakażonych szczepem homologicznym do szczepionkowego) (Austin i wsp., 2003). W innych badaniach, prowadzonych w Hiszpanii, wykazano, że autoszczepionka przeciwko wrzodzienicy u skarpa (*Scophthalmus maximus*), po podaniu drogą iniekcji dootrzewnowej, wykazywała istotnie wyższą skuteczność w warunkach laboratoryjnych (RPS 99%) niż szczepionka komercyjna AquaVac Furovac 5 (RPS 72%). W próbach terenowych, skuteczność autoszczepionki była również wysoka (RPS 83% po 630 dniach), ale doustne podanie szczepionki AquaVac Furovac 5 oral, rybom wcześniej immunizowanym dootrzewnowo autoszczepionką, nie powodowało wzrostu odporności ochronnej ryb na zakażenie *A.salmonicida* ssp. *salmonicida* (Santos i wsp., 2005). Ciekawym aspektem tych badań jest fakt, iż analiza taksonomiczna wykazała biochemiczną, serologiczną i genetyczną homologię pomiędzy szczepami *A.salmonicida* ssp.*salmonicida* izolowanymi od ryb łososiowatych i skarpa (Toranzo i wsp., 1991; Toranzo i Barja, 1992). Jednak pomimo to, szczepionka AquaVac Furovac 5 (zawierająca bakteryiny szczepów ryb łososiowatych) wykazywała znacznie niższą skuteczność niż autoszczepionka. Wskazuje to, iż szczepionka i procedury szczepień powinny być dostosowane dla określonego gatunku ryb oraz specyficznych warunków ich hodowli na każdym etapie (Santos i wsp., 2005). Należy w tym miejscu zaznaczyć, że szczepionki przeciwko wrzodzienicy, dopuszczone do stosowania w Polsce, przeznaczone są dla łososia atlantyckiego. W naszym kraju, problem związany z tą chorobą dotyczy przede wszystkim pstrąga źródlanego, zatem skuteczność tych szczepionek dla tego gatunku ryb może okazać się znacznie niższa, niż dla łososia.

W świetle przedstawionych wyżej danych, stosowanie autoszczepionek w produkcji ryb, wydaje się być nie tylko koniecznym, ale także najlepszym i najtańszym rozwiązaniem w postępowaniu profilaktycznym przeciwko chorobom bakteryjnym, powodującym liczne śnięcia, a przez to przynoszącym znaczne straty ekonomiczne. Jednak ich produkcja nie może mieć charakteru „chałupniczego”. Musi być poprzedzona badaniami laboratoryjnymi, następnie próbami w terenie, aby przygotowany produkt przynosił wymierne efekty i był bezpieczny dla ryb.

Wychodząc naprzeciw potrzebom hodowców, w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB w Puławach, podjęto badania w kierunku opracowania i oceny skuteczności autoszczepionek przeciwko jersiniozie. W tym celu zgromadzono 15 izolatów *Yersinia ruckeri* z 5 gospodarstw rybackich, pochodzących od pstrągów tęczowych z objawami jersiniozy. Określono właściwości biochemiczne i serologiczne oraz zjadliwość izolatów. Wszystkie izolaty należały do serotypu O1 (wg klasyfikacji Davies, 1990), jednak wykazywały różnice biochemiczne. Izolaty różniły się także stopniem zjadliwości, co wykazano po eksperymentalnym zakażeniu zdrowych pstrągów tęczowych. Przy zastosowaniu jednakowej dawki bakterii w inokulacji, objawy chorobowe i/lub śnięcia ryb w poszczególnych grupach doświadczalnych wynosiły od 40% do 80%, zależnie od izolatu użytego do zakażeń. Do przygotowania doświadczalnych autoszczepionek wybrano 2 izolaty silnie zjadliwe i 1 izolat średnio zjadliwy. Po ustaleniu optymalnej dawki i czasu trwania ekspozycji ryb na antygen (podawany w kąpieli) oraz sprawdzeniu

bezpieczeństwa autoszczepionek, przeprowadzono badanie ich skuteczności w warunkach laboratoryjnych i terenowych. Badania przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych wykazały, iż są one wysoce skuteczne – względna przeżywalność ryb (RPS) po zakażeniu szczepem homologicznym wynosiła od 93,8% do 100%. Nie obserwowano żadnych objawów chorobowych. W kolejnym doświadczeniu porównano skuteczność autoszczepionki, zawierającej antygeny jednego szczepu *Y.ruckeri* (Yr1) wobec szczepu homologicznego i 2 szczepów heterologicznych, pochodzących z innych gospodarstw. W grupie ryb szczepionych, a następnie zakażonych homologicznym szczepem Yr1, nie obserwowano śnięć ani też innych objawów chorobowych (RPS 100%), podczas gdy ryby szczepione przy użyciu tej samej autoszczepionki, ale zakażone szczepami heterologicznymi, wykazywały znacznie niższą odporność ochronną (RPS 50% - 60%). Wskazuje to, że autoszczepionki, chociaż w pewnym stopniu zwiększają odporność ochronną ryb przed szczepami innego pochodzenia, nie wykazują właściwości uniwersalnych. Oczywiście, wyniki badań laboratoryjnych nie zawsze w pełni pokrywają się z wynikami badań prowadzonych w warunkach terenowych, gdzie ryby są narażone na zmiany temperatury i inne czynniki stresogenne, a ponadto istnieje możliwość pojawienia się, w określonym obiekcie, nowych szczepów o innych właściwościach, a może nawet o wyższej zjadliwości. Próby terenowe przeprowadzono w 4 gospodarstwach rybackich. Jednak trudno jest, w sposób wymierny, ocenić rezultaty tych badań. Pomimo, że hodowcy zostali poinformowani o konieczności pozostawienia części ryb nie szczepionych (grupa kontrolna), dotychczas nie uzyskano żadnych informacji umożliwiających porównanie wielkości strat w grupie ryb szczepionych i kontrolnych. O skuteczności autoszczepionek może tylko świadczyć zainteresowanie hodowców systematycznym stosowaniem tego rodzaju produktu, co będzie możliwe po zakończeniu badań laboratoryjnych, które przewiduje się na koniec 2010 roku. Warto też zaznaczyć, że 1 litr szczepionek komercyjnych, przeznaczonych do aplikacji w kąpeli wystarcza na zaszczepienie 100 kg ryb. W Zakładzie Chorób Ryb udało się opracować metodę przygotowania zawiesiny, w której stężenie antygeny w 1 litrze preparatu pozwala na zaszczepienie 500 kg ryb, przy zastosowaniu optymalnej dawki antygeny. Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia możliwości znacznego obniżenia kosztów szczepienia ryb.

Obecnie, hodowcy pstrąga źródłanego zainteresowani są autoszczepionkami przeciwko wrzodzienicy zwracając się z prośbą do Zakładu Chorób Ryb PIWet-PIB o pomoc w tym zakresie. Jest to nowe wyzwanie dla naszego laboratorium, jednak podjęcie badań w tym zakresie wymaga sporych nakładów finansowych. Ze względu na specyficzne warunki wymagane do hodowli *A.salmonicida* ssp. *salmonicida*, wywołujących wrzodzienie (temperatura nie powinna przekraczać 25°C), konieczny jest odpowiedni, kosztowny sprzęt z możliwością chłodzenia i intensywnego mieszania zawiesiny, podczas namnażania bakterii. Ponadto, badania nad opracowaniem podstaw do produkcji tych autoszczepionek wymagają znacznego nakładu pracy, ze względu na konieczność przygotowania odpowiedniego produktu do stosowania w immersji jak też drogą wstrzykiwań dootrzewnowych. Liczne badania wykazały bowiem, iż szczepionki przeciwko wrzodzienicy, podane rybom tylko drogą immersji, wykazują niewielką i krótkotrwałą skuteczność. Najlepsze efekty uzyskuje się po podaniu drogą wstrzykiwań, rybom starszym (powyżej 20g).

Należy podkreślić, że dla osiągnięcia dobrych rezultatów stosowania autoszczepionek,

konieczna jest ścisła współpraca hodowcy z laboratorium przygotowującym te produkty. W okresie wstępnych badań konieczne jest, przede wszystkim, pozostawienie części ryb z danej populacji jako grupę kontrolną (nie szczepioną). Pozwoli to określić względny procent przeżywalności ryb (RPS), po zastosowaniu autoszczepionek w terenie. Ponadto, hodowca powinien obserwować czas trwania odporności poszczepiennej, a w przypadku pojawienia się pierwszych oznak choroby u ryb szczepionych, skontaktować się z laboratorium i dostarczyć chore ryby do badania, celem izolacji patogenu oraz ustalenia jego homologii w stosunku do szczepu szczepionkowego. W przypadku stwierdzenia różnic pomiędzy szczepami, wskazane byłoby użycie nowego szczepu (lub też kilku szczepów) do przygotowania następnej autoszczepionki. Ponadto, ze względu na specyfikę bakterii *A.salmonicida*, wywołujących wrzodnicę, istnieje konieczność pozyskiwania „świeżych” izolatów do przygotowania autoszczepionek. Bakterie te, zarówno podczas pasażowania na pożywkach sztucznych, jak również przechowywane przez dłuższy okres w stanie zamrożenia lub liofilizatu, stopniowo tracą zewnętrzną otoczkę białkową (A-layer), która ma zasadnicze znaczenie w chorobotwórczości tych mikroorganizmów oraz jako podstawowy antygen immunogeny (Lund i wsp., 2009). Formy bezotoczkowe (gładkie) tracą zjadliwość i właściwości immunogenne.

W podsumowaniu, należy podkreślić, że stosowanie autoszczepionek, podobnie jak szczepionek komercyjnych, nie uwolni gospodarstw rybackich od ponownego pojawiania się chorób bakteryjnych, jednak może w znacznym stopniu ograniczyć straty oraz zminimalizować stosowanie antybiotyków, które nie tylko zanieczyszczają środowisko, powodują narastanie oporności bakterii na leki, ale także obniżają naturalną odporność ryb na zakażenia bakteryjne i wirusowe. Jak wynika z informacji ustnych pozyskanych od hodowców, jersinioza pojawiająca się po pewnym czasie u ryb szczepionych ma łagodny przebieg i ustępuje po zastosowaniu niewielkich dawek antybiotyku. Przy ścisłej współpracy hodowców ze służbą weterynaryjną oraz laboratorium przygotowującym autoszczepionki możliwe jest opracowanie odpowiednich programów szczepień np. powtórne szczepienie w najbardziej korzystnym okresie, kiedy słabnie odporność organizmu ryby po pierwszym szczepieniu i istnieje ryzyko pojawienia się choroby.

Piśmiennictwo

1. Austin B., Austin, D.A. Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish, 4th ed., Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 2007.
2. Austin D.A., Robertson P.A.W., Austin B.: Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Systematic of Applied Microbiology, 2003, 26, 127-131.
3. Bullock G.L., Anderson D.P.: Immunization against *Yersinia ruckeri*, cause of enteric redmouth disease. W: De Kinkelin P. (ed.). Symposium of Fish Vaccination; Theoretical background and practical results on immunization against infectious diseases. Paris, OIE, 1984, 151-166.
4. Davies R.L.: O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. Veterinary Microbiology, 1990, 22, 299-307.
5. Flett D.E.: O-antigen serogroups of *Yersinia ruckeri*. M.Sc. Thesis, University of Guelph, 1989.

6. Fouz B., Zarza C., Amaro C.: First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29, 339-346.
7. Klein B.U., Kleingeld D.W., Böhm K.H.: First isolation of a non-motile/Tween 80 negative *Yersinia ruckeri* strain in Germany. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1994, 14, 165-166.
8. Kozińska A., Pękala A.: Występowanie *Yersinia ruckeri* u ryb łososiowatych w Polsce I fenotypowa charakterystyka izolatów. *Medycyna Weterynaryjna*, 2004, 60, 880-882.
9. Lund V., Mikkelsen H., Schröder M.B.: Atypical furunculosis vaccines for Atlantic cod *Gadhus morhua*: impact of reattached *Aeromonas salmonicida* A-layer protein on vaccine efficacy. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 85, 115-122.
10. Pękala A.: Charakterystyka fenotypowa i genotypowa krajowych izolatów *Yersinia ruckeri* w aspekcie ich patogenności dla ryb. Praca doktorska, PIWet-PIB, Puławy, 2008.
11. Santyos Y., Garcia-Marquez S., Pereira P.G., Pazoz F., Rianza A., Silva R., El Morabit A., Ubeira F.M.: Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): evaluation of immersion, oral and injection delivery. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28, 165-172.
12. Toranzo A.E., Santos Y., Núñez S., Barja J.L. : Biochemical and serological characteristics, drug resistance and plasmid profiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Gyobyo Kenkyu*, 1991, 26, 55-60.
13. Toranzo A.E., Barja J.L.: First report of furunculosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) rearing in floating cage in North-West of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1992, 12, 147-149.