پادتن‌های ضد باکتری ویبریوانگوئیلاروم در سرم خون ماهیهای قزل‌آلای پرورشی

دکتر سجاد غاضی ـ دکتر مصطفی اخلاقی
دانشکده دامپزشکی شیراز
بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان، صندوق پستی ۱۷۳۱-۷۱۳۴۵

چکیده

بمنظور تعیین عیار پادتن‌های ضد باکتری و ویبریوانگوئیلاروم بیماریزا در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان که در معرض این باکتری قرار گرفته‌اند ۳۰۰ نمونه خون از این ماهیها با سن بین ۹ تا ۱۲ ماهگی از ۴ مزرعه پرورشی واقع در شمال و غرب استان فارس جمع‌آوری و سرم خونی آنها با آزمایش الیزای غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفت. با بکار بردن دو نوع آنتی ژن (آنتی ژن محلول و آنتی ژن سلول کامل) مشخص گردید که از ۳۰۰ نمونه سرم مورد آزمایش ۱۶۲ نمونه (۵۴٪) با بکار بردن آنتی ژن محلول و ۱۵۹ نمونه (۵۳٪) با بکار بردن آنتی ژن سلول کامل دارای آنتی بادی‌های ضد باکتری ویبریوانگوئیلاروم هستند. میزان سرم‌های مثبت در مزرعه شماره ۲ که علایم کلینیکی بیماری ویبریوزیس را نیز نشان می‌داد ۸۳ درصد (بیشترین) و در مزرعه شماره ۳ بمیزان ۳۶ درصد (کمترین) بود که گویای خطر در معرض قرار گرفتن ماهی‌هایی است که از پودر و غذای ماهی دریایی بصورت خام در جیره روزانه خود استفاده می‌نمایند. در این مقاله اهمیت بیماری ویبریوزیس در ماهیهای قزل‌آلای پرورشی در آبهای شیرین داخلی بطور کامل مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

مقدمه

بیماری ویبریوزیس ماهی، بیماری باکتریایی است که در ماهیان پرورش داده شده در آبهای شور و لب شور (Muroga,1975)، ماهیانی که بخصوص در قفس در خلیج‌ها پرورش داده می‌شدند (Ohnishi & Muroga , 1976)، ماهیان آبهای شیرین (Ghittino & Andruetto, 1977) و در قزل‌آلاهای رنگین کمان پرورش داده شده در آبهای شیرین (Giorgetti & Ceschia , 1982) اتفاق می‌افتد. ویبریوانگوئیلاروم عامل بیماری ویبریوزیس جزو فلور طبیعی آبهایی با شوری از ۱ تا ۳۵ درهزار و درجه حرارتهای ۹ تا ۳۱ درجه سانتیگراد می‌باشد (Cameron et al., 1988) و همچنین در دستگاه گوارش ماهیان یافت می‌شود. عامل بیماری در شرایط استرس (تراکم زیاد) در ماهیان دریایی از جمله ماهیان خلیج فارس (سیم دریایی پرورشی) باعث ایجاد بیماری ویبریوزیس شده است (Rasheed , 1989).

با استفاده از پودر ماهیهایی که از ماهیان صید شده دریایی و محصولات آنها تهیه شده‌اند در غذای ماهیهای آبهای شیرین از جمله قزل‌آلای رنگین کمان، این ماهیها در معرض آلودگی به این بیماری قرار گرفته و بیماری در حالتهای حاد تا مزمن اتفاق می‌افتد که می‌تواند تلفاتی را تا ۵۰ درصد و خسارات اقتصادی زیادی را بدنبال داشته باشد (Giorgetti & Ceschia , 1982). این بیماری در بیش از ۱۴ کشور جهان گزارش شده که در بیش از ۴۸ نوع ماهی ایجاد تلفات می‌نماید (Austin and Austin , 1993). تاکنون هیچ گزارشی حاکی از وقوع بیماری در ایران موجود نیست.

هدف از این تحقیق بررسی وجود پادتن‌های موجود در سرم خون ماهیان قزل‌آلای پرورشی در آبهای شیرین استان فارس نسبت به باکتری بیماریزای ویبریوانگوئیلاروم توسط آزمایش دقیق و حساس الیزا بود تا مشخص نمائیم آیا قزل‌آلاها در معرض این باکتری قرار گرفته‌اند و همچنین بتوانیم ارزیابی از وقوع بیماری ویبریوزیس در ماهیان پرورشی بمنظور اقدامات پیشگیری کننده در آینده داشته باشیم.

مواد و روشها

تعداد ۳۰۰ نمونه خون از ماهیهای قزل‌آلای ۴ مزرعه پرورشی در شمال و غرب استان فارس جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

جدول ۱ : کارگاههای تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای استان فارس که در این تحقیق از آنها نمونه جمع‌آوری شد

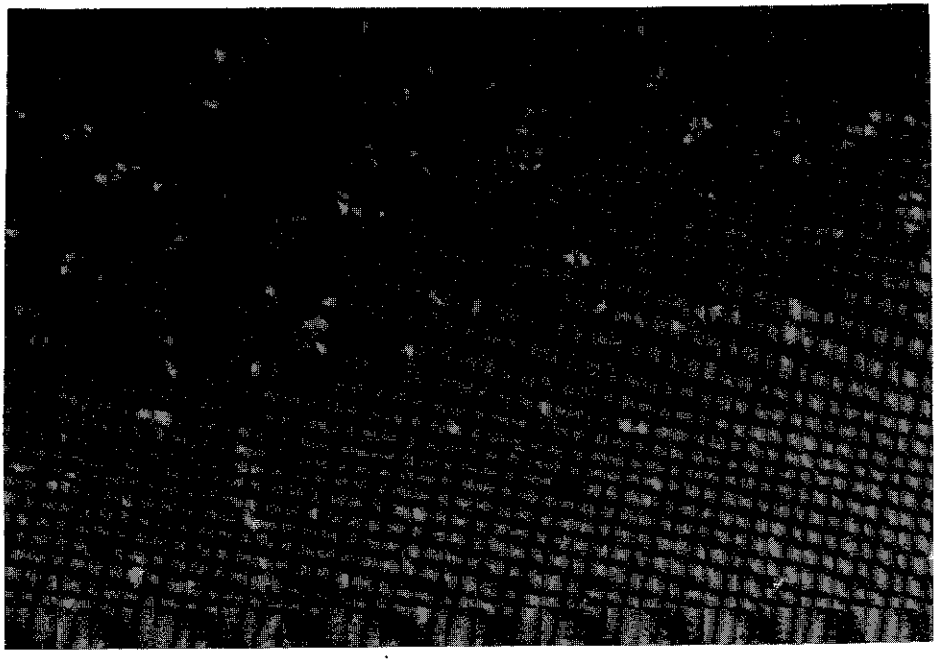
محل نمونه‌گیری	تعداد نمونه‌ها	سن ماهیان (ماه)	ظرفیت اسمی مزرعه (تن)	تاریخ نمونه‌گیری
۱ـ مزرعه تکثیر و پرورش قزل‌آلای سد دوردزن	۱۰۰	۱۰	۱۵۰	۷۴/۵/۱۰
۲ـ شرکت پرورش ماهی قزل‌آلای چشمه بناب	۱۰۰	۱۲	۱۸۲	۷۴/۵/۱۲
۳ـ مزرعه پرورشی قزل‌آلای سراب بیضاء	۵۰	۹	۵۰	۷۴/۷/۳۰
۴ـ مزرعه پرورشی قزل‌آلای فارس قزل ۷۲۷	۵۰	۹	۵۰	۷۴/۸/۲۵

خونگیری از سیاهرگ دمی پس از بیهوش کردن ماهیان با بیهوش کننده ام ـ اس ۲۲۲ به ازای یک گرم در ۲۰ لیتر بعمل آمد. از هر ماهی با سن متوسط ۹ ماه حدود ۲ میلی‌لیتر خون جمع‌آوری و در داخل لوله آزمایش قرار داده شد.

نمونه‌ها در شرایط درجه حرارت یخچال به آزمایشگاه منتقل شدند و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سرم نمونه‌های خون جدا و در شیشه‌های بیژو منتقل شده و در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتیگراد جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

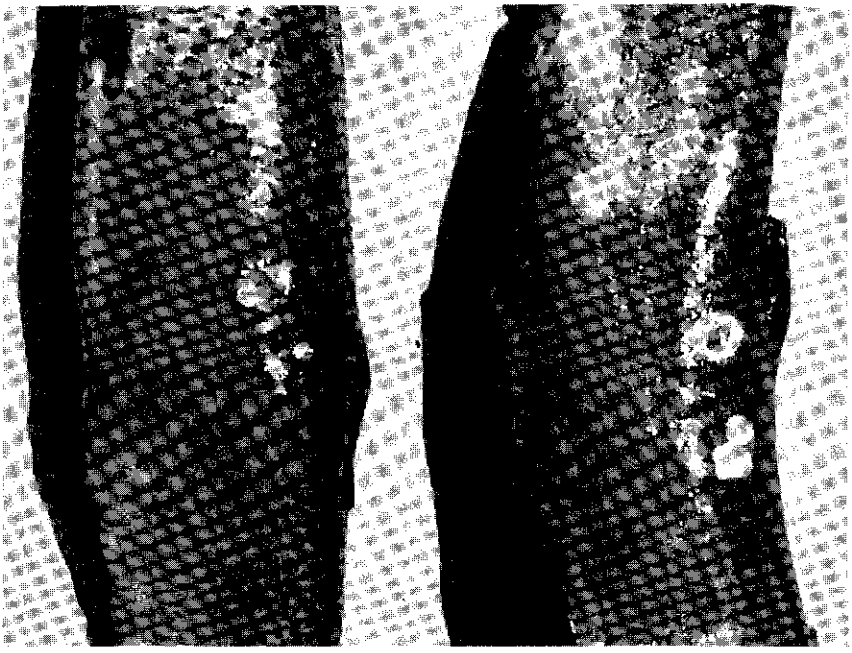
ده نمونه از غذای پلت مصرفی ماهیها و ۱۰ نمونه مدفوع از کارگاه شماره ۲ جمع‌آوری و در

محیط تی اس بی کشت اولیه داده شد و سپس با کشت‌های بعدی روی محیط تی سی بی اس و آزمایشهای بیوشیمیایی جدا کردن باکتری ویبریوانگوئیلاروم دنبال شد. درجه حرارت جهت رشد باکتریها ۲۵ درجه سانتیگراد بمدت ۴۸ ساعت در هر مرحله بود. برای جدا کردن باکتری ویبریوانگوئیلاروم از پوست و آبشش‌های ۵ ماهی قباد و ۵ ماهی شوریده صید شده از خلیج فارس نمونه‌گیری بعمل آمد. بیو تایپ باکتریهای جدا شده تعیین شد (Bryant et al., 1986 ; Quinn et al , 1994). شکل ۱ باکتری‌های رنگ‌آمیزی شده با نیگروزین را نشان می‌دهد.



شکل ۱ : باکتریهای ویبریوانگوئیلاروم جدا شده در رنگ‌آمیزی نیگروزین (۱۰۰۰×)، باکتری‌ها دارای انحنای مشخصی هستند

نمونه‌های ماهی با علائم مشکوک به ویبریوزیس در استخرهای پرورشی کارگاه چشمه بناب در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲ : علائم کلینیکی، ضایعات زخمی پوست در ماهیهای قزل‌آلای پرورشی یکساله مشکوک به ویبریوزیس مزمن

برای اندازه‌گیری پادتن‌های ضد ویبریوانگوئیلاروم در سرم خون ماهیان از آزمایش الیزا غیرمستقیم استفاده گردید (Whittington et al., 1994). در این آزمایش از دو نوع آنتی ژن : آنتی‌ژن سلول کامل از باکتری بیوتایپ سی جدا شده از ماهیان خلیج فارس و آنتی‌ژن محلول (سونیکیت شده) استفاده گردید و تمام نمونه‌های سرم با این دو آنتی‌ژن بطور مجزا در آزمایش الیزا مورد استفاده قرار گرفتند. سایر مواد استفاده شده در آزمایشها یکسان بودند. مراحل آزمایش الیزا و مواد استفاده شده به قرار ذیل می‌باشند :

۱ ـ سطح حفره‌های پلیت پلی استرین ۹۶ حفره‌ای (لینبرو) با ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن پوشانیده شده و پلیت‌ها در ۴+ درجه سانتیگراد بمدت یک شب نگهداری شدند.

۲ ـ مسدود کردن : آنتی‌ژنها از حفرات خالی گردیدند و ۱۰۰ میکرولیتر محلول سرم فیزیولوژی،

حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ و یک درصد ژلاتین، اضافه شد و پلیتها در دمای اتاق بمدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند.

۳ ـ خالی کردن محلول مسدود کننده و شستشو با آب مقطر حاوی ۰/۰۵ درصد توئین، اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم مورد آزمایش و نگهداری پلیتها در دمای اتاق بمدت ۱/۵ ساعت. از هر نمونه سرم در دو حفره (با یک تکرار) استفاده گردید.

۴ ـ خالی کردن سرم‌ها و شستشو با آب مقطر حاوی ۰/۰۵ درصد توئین و اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از منوکلونال آنتی‌بادی (ایمینوگلوبولین‌های موش ضد ایمینوگلوبولین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان متصل به آنزیم HRPO) در هر حفره و نگهداری پلیتها در دمای اتاق بمدت ۱/۵ ساعت.

۵ ـ خالی نمودن منوکلونال آنتی‌بادی و شستشو (همانند مراحل قبل) و اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول کانجوگه (ایمینوگلوبولین‌های خرگوش علیه ایمینوگلوبولین‌های موش ساخت انستیتو داکوی هلند متصل به آنزیم HRPO) و نگهداری پلیتها بمدت ۱/۵ ساعت در درجه حرارت اتاق.

۶ ـ خالی کردن و شستشوی کانجوگه و افزودن ۵۰ میکرولیتر سوبسترای رنگزا (محلول ABTS ساخت کارخانه مرک) و نگهداری در دمای اتاق روی بهم‌زن بمدت ۳۰ دقیقه.

۷ ـ اضافه نمودن محلول متوقف کننده واکنش (اسید سیتریک و سدیم آزاید) بمیزان ۲۵ میکرولیتر در هر حفره و سپس قرائت نتایج در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه خواندن پلیت ۹۶ حفره‌ای فلو ساخت دانمارک.

در هر پلیت، دو حفره جهت استفاده از سرم منفی و دو حفره جهت استفاده از سرم مثبت تهیه شده از آزمایشگاه مرجع استرالیا بعنوان شاهدهای آزمایش استفاده گردید. جهت تدوین آزمایش الیزا و تعیین بهترین رقت‌های آنتی‌ژن، آنتی سرم، شاهد و کانجوگه، آزمایش‌های متعددی صورت گرفت و بهترین رقت‌ها در آزمایش‌های اصلی استفاده گردیدند. برای تعیین حد مرزی، میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی به اضافه ۳ انحراف معیار در نظر گرفته شد. نمونه‌های مجهول سرمی با جذب نوری بالاتر از این میزان مثبت و پائین‌تر از آن منفی قلمداد شدند. تعیین ضریب نوسانات بین پلیتها نیز محاسبه گردید. میزان جذب نوری سرم‌های مجهول از چهار مزرعه توسط آزمایش آماری آنالیز واریانس و از هر دو مزرعه آزمایش توکی کرامر توسط نرم‌افزار جی ام پی با استفاده از کامپیوتر مکینتاش مورد مقایسه

قرار گرفت.

نتایج

نتایج بدست آمده از انجام آزمایش الیزا روی ۳۰۰ نمونه سرمی در ماهیان قزل‌آلای مناطق شمال و غرب فارس در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲ : تعداد موارد مثبت و منفی پادتن‌های ضد ویبریوانگوئیلارم در آزمایش الیزا بر روی سرمهای ماهی‌های قزل‌آلا به تفکیک نوع آنتی‌ژن در مزارع چهارگانه براساس حد مرزی*.

تعداد موارد		آنتی‌ژن محلول (درصد)	آنتی‌ژن سلول کامل (درصد)	مجموع موارد** (درصد)	میزان انطباق*** (درصد)
مزرعه ۱	مثبت	۴۷	۴۶	۴۷	۴۶ (۹۷/۹)
	منفی	۵۳	۵۴	۵۳	۵۲ (۹۸/۱)
مزرعه ۲	مثبت	۸۳	۸۱	۸۲	۸۰ (۹۷/۶)
	منفی	۱۷	۱۹	۱۹	۱۷ (۸۹/۵)
مزرعه ۳	مثبت	۱۳ (۲۶)	۱۳ (۲۶)	۱۴ (۲۸)	۱۲ (۸۵/۷)
	منفی	۳۷ (۷۴)	۳۷ (۷۴)	۳۸ (۷۶)	۳۶ (۹۴/۷)
مزرعه ۴	مثبت	۱۹ (۳۸)	۱۹ (۳۸)	۲۰ (۴۰)	۱۸ (۹۰)
	منفی	۳۱ (۶۲)	۳۱ (۶۲)	۳۲ (۶۴)	۳۰ (۹۳/۷)
مجموع نمونه‌ها	مثبت	۱۶۲ (۵۴)	۱۵۹ (۵۳)	۱۶۳ (۵۴)	۱۵۶ (۹۵/۷)
	منفی	۱۳۸ (۴۶)	۱۴۱ (۴۷)	۱۴۱ (۴۷)	۱۳۵ (۹۵)

* میانگین جذب نوری شاهد منفی به اضافه ۳ انحراف معیار.

** مجموع مواردی که با یکی از دو آنتی‌ژن‌ها جواب مثبت یا منفی داشته‌اند.

*** تعداد مواردی که با هر دو آنتی‌ژن جواب مثبت یا منفی داشته‌اند و درصد آنها نسبت به مجموع موارد.

در تدوین آزمایش الیزا با استفاده از دو نوع آنتی‌ژن محلول و سلول کامل قرابت آنتی‌ژنیکی زیادی بین دو نوع آنتی‌ژن دیده شد (جدول ۳)

جدول ۳ : حد مرزی تعیین شده برای دو نوع آنتی‌ژن در تدوین آزمایش الیزا با استفاده از سرم منفی ماهی قزل‌آلا

	نوع آنتی ژن	
	آنتی‌ژن محلول	آنتی‌ژن سلول کامل
تعداد نمونه‌ها	۳۰	۳۰
میانگین جذب نوری	۰/۰۴۲	۰/۰۴۷
انحراف معیار	۰/۰۴۰	۰/۰۴۵
حد مرزی	۰/۱۶۲	۰/۱۸۲

جدول ۴ ضریب نوسانات شاهدهای مثبت در زمانهای مختلف به تفکیک نوع آنتی‌ژن را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود ضریب نوسانات هیچکدام بالاتر از ده درصد نبود که نشاندهندهٔ دقت آزمایشهای انجام شده می‌باشد.

جدول ۴ : ضریب نوسانات شاهدهای مثبت در روزهای مختلف آزمایش الیزا به تفکیک نوع آنتی‌ژن

نوع آنتی‌ژن	نمونه شاهد مثبت	میانگین	انحراف معیار	ضریب نوسانات
آنتی‌ژن محلول	آزمایش ۱	۰/۶۹	۰/۰۳۸	۵/۵
	آزمایش ۲	۰/۶۳	۰/۰۳۵	۵/۵
	آزمایش ۳	۰/۶۲	۰/۰۳۹	۶/۲۹
	آزمایش ۴	۰/۶	۰/۰۴۱	۶/۸۳
آنتی‌ژن سلول کامل	آزمایش ۱	۰/۸۷	۰/۰۷۴	۸/۵
	آزمایش ۲	۰/۷۳	۰/۰۶۸	۹/۳۱
	آزمایش ۳	۰/۸۷	۰/۰۷۳	۹/۳۵
	آزمایش ۴	۰/۸۱	۰/۰۷۵	۹/۳۵

با توجه به پائین بودن ضریب نوسانات در آزمایشهای الیزای انجام شده قابل اطمینان بودن میزان متوسط عیار سرمی (۵۴٪) در چهار مزرعه مورد آزمایش که بیشترین عیار پادتن‌ها در مزرعه شماره ۲ (۸۳٪) و کمترین در مزرعه شمارهٔ ۳ (۲۶٪) به اثبات رسید.

از ده نمونه غذای پلت شده مزرعه شماره ۲ که جهت دنبال کردن وجود باکتری و ویبریوانگوئیلاروم نمونه‌گیری شده بودند در هیچکدام از غذاها باکتری مورد نظر جدا نشد ولی از مدفوع ماهیان این مزرعه دو مورد باکتری ویبریوانگوئیلاروم بیوتایپ سی جدا گردید.

بحث

از آنجا که بنظر می‌رسد تنها راه ورود باکتری ویبریوانگوئیلاروم به یک مزرعه پرورشی ماهی قزل‌آلای آب شیرین راه غذایی باشد این احتمال وجود دارد که این مزارع در ماههای قبل از زمان خونگیری یا از ماهیان دریایی آلوده جهت تغذیه ماهیان پرورشی استفاده نموده‌اند و یا پودر ماهی موجود در غذای پلت شده حاوی باکتری ویبریوانگوئیلاروم بوده است. اگرچه ترکیب دقیق جیره غذائی این کارگاهها در طی مطالعه در اختیار نگارندگان قرار نگرفت لیکن در زمان نمونه‌گیری از کارگاه چشمه بناب شاهد استفاده از ماهیان ریز ارزان قیمت خلیج فارس بصورت تازه به عنوان غذا بودیم که پلت‌ها در کارگاه تهیه و پس از در معرض هوا قرار دادن استفاده می‌گردید. سایر کارگاهها ترکیب دقیق جیره مصرفی خود را چه از لحاظ استفاده پلت کارخانه‌ای یا تازه در اختیار نگذاشته و موردی از استفاده از ماهی چرخ شده دریایی در غذای روزانه ماهیهای پرورشی مشاهده نشد. وجود تعداد زیاد باکتری ویبریوانگوئیلاروم بیوتایپ سی که در نمونه‌های گرفته شده از ماهیان خلیج فارس این احتمال را قوی‌تر می‌سازد که با استفاده از ماهیان دریایی، میگو و سایر آبزیان دریایی در غذای ماهیان پرورشی، قزل‌آلاها براحتی در معرض این باکتری قرار می‌گیرند و از آنجا که این ماهی در دوره پرورش به اشکال مختلف تحت شرایط استرس قرار گرفته زمینه مساعدی برای تجمع باکتری و حمله آن از طریق گوارش به دستگاههای بدن فراهم شده که تعدادی از ماهیهای جوان بدون بروز علائمی تلف شده و درصد دیگری نیز بیماری را در شکل مزمن نشان می‌دهند.

در هنگام خونگیری از ماهیان با گرفتن نمونه از مواد غذائی پخته شده کارخانه‌ای موجود و کشت آنها بر روی محیطهای اختصاصی سعی در جداسازی این پاتوژن بعمل آمد که در هیچ مورد این باکتری جدا نشد. جدا نشدن باکتری دلیل بر عدم وجود این پاتوژن در مواد غذائی ماهیان قبل از زمان نمونه‌گیری نمی‌باشد به این دلیل که تعداد نمونه‌های گرفته شده در این تحقیق زیاد نبوده‌اند تا بتوان باکتری را جدا نمود.

بالا بودن عیار پادتن‌های اختصاصی ضد ویبریوانگوئیلاروم در سرم خون ماهیها نشان دهنده در معرض قرار گرفتن ماهیها در زمان تغذیه فعالشان می‌باشد که خود می‌تواند در ماههای اولیه زندگی خطر آفرین باشد و ویبریوزیس بصورت حاد اتفاق بیفتد. در سنین بالاتر احتمال وقوع بیماری بصورت مزمن است که بدلیل ایجاد ایمنی تدریجی در طول دوره پرورش می‌باشد. جدا شدن باکتری ویبریوانگوئیلاروم از مدفوع ماهیها نیز گویا تزاید این باکتری در دستگاه گوارش است لیکن ایجاد شرایط استرس برای وقوع بیماری را می‌طلبد.

ویبریوانگوئیلاروم مشابه سروتیپ ـ یک بیماریزا در سیم دریایی پرورش داده شده در سواحل کویت حاکی از وجود سروتیپ‌های بیماریزا در آبهای خلیج فارس است که پس از استفاده از میگوها و ماهی‌های چرخ شده و مورد استفاده قرار گرفته شده، بیماری ویبریوزیس را ایجاد می‌کنند (Rasheed , 1989). این باکتری نیز بصورت آزمایشی در تزریق به ماهیان انگشت قد ۲۰ گرمی برای ماهیان کشنده بوده‌اند.

از آنجا که ویبریوانگوئیلاروم در آب شیرین خیلی زود (کمتر از یکساعت) از بین می‌رود (اخلاقی، گزارشهای منتشر شده) میزان آلوده شدن ماهیهای حساس دیگر از این طریق ناچیز است مگر اینکه بافتهای مخاطی و مدفوع رها شده در آب زیاد باشد که باکتری بتواند تا ساعتها خود را حفظ کند. راه اصلی برای آلوده ساختن ماهیهای آب شیرین استفاده از پودر ماهی، زواید ماهی و میگوهای دریایی ریز که بدون عمل‌آوری بهداشتی در غذای ماهیهای قزل‌آلای آب شیرین قرار می‌گیرند، می‌باشد.

در تهیه پلت‌های کارخانه‌ای از حرارت مرطوب استفاده می‌گردد که به منظور بدست آوردن قوام پایدار پلت‌ها و همچنین ضد عفونی بکار برده می‌شود. لیکن در مراجعه، درجه دقیق حرارت

مورد استفاده بلحاظ اهمیت تجارتی فرمول غذائی در اختیار قرار داده نشد. لازم است با تحقیقات بیشتر تعداد زیادتری از نمونه غذاهای پلت شده و مورد استفاده در هر کارگاه تهیه و باکتری مورد نظر جدا شده، تعیین سویه گردد و با ایجاد بیماری آزمایشی بیماریزا بودن آن به اثبات برسد تا بدینوسیله نه تنها کنترل بیشتری روی بهداشتی نمودن هر چه بیشتر جیره غذائی داشته باشیم بلکه در صورت لزوم استفاده از واکسن نیز در برنامه کارگاهها قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از بخش‌های مختلف دانشکده دامپزشکی و بخصوص سرکار خانم محترم کشاورزی کارشناس آزمایشگاه میکروبشناسی، بخش ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی شیراز، شیلات محترم استان فارس کارگاههای پرورش ماهی قزل‌آلای فارس بخاطر همکاری بیدریغ تشکر بعمل می‌آید. قسمتی از بودجه این تحقیق توسط مؤسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران تأمین گردید.

منابع

Austin, B. ; Austin, D.A., 1993. Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood. New York. 384 P.

Bryant, T.N. ; Lee, J.V. ; West,. P.A. and Colwell, R.R., 1986. Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. J. APPL. Bact. 61: 437-467

Cameron, D.E. ; Garland, C.D. ; Lews, T.E. and Machin, P.J., 1988. A survey of vibrionaceae in Tasmanian coastal water with special reference to bacterial species pathogenic to fish or shellfish. Austral. J. Marine of Freshwater Res. 39: 145-152

Ghittino, P. & Andruetto, S., 1977. Fish vibriosis in fresh and salt waters in Italy. Office International des Epizooties, Bulletin. 87: 483-485

Giorgetti, G. and Ceschia, G., 1982. Vibriosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)

Richardson in freshwater in north-eastern Italy. J. Fish. Diseases. 5: 125-130

Muroga, k., 1975. Studies on *Vibrio auguillarum* and *V. anguillicida* infections. J. of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University. 14:101-205

Ohnishi, K., and Muroga, 1976. Studies on *Vibrio sp.* as a cause of disease in rainbow trout cultured in Japan I. Biochemical characteristics Fish Pathol. 11: 159-165

Quinn, P.J. ; Carter, M.E.; Markey, B. and Carter, G.R., 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolf Publication. London. pp: 243-247

Rasheed, V., 1989. Vibriosis outbreak among cultured seabream (*Acanthopagrus cuvieri*) broodstock in Kuwait. Aquaculture. 76:189-197

Whittington R.J., Munday, B.L. ; Akhlaghi, M. ; Reddaclife, G.L. and Carson, J., 1994. Humoral and Peritoneal cell responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to ovalbumin, *Vibrio anguillarum* and freund's complete adjuvant following intraperitoneal and bath immunisation. Fish & Shellfish Immunol. 4: 475-488