

## **Pengembangan Immunodiagnostik untuk Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan**

### ***Development of Immunodiagnostic for Aeromonas hydrophila Infection in the Fish***

**Yuli Purwandari Kristianingrum\*, Sitarina Widyarini, Kurniasih, Bambang Sutrisno, Charles Rangga Tabbu, Sugiyono**

Departemen Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada  
Jl. Fauna No.2 Karangmalang, Yogyakarta 55281

\*Email : [yuli\\_purwandari@gmail.com](mailto:yuli_purwandari@gmail.com)

Naskah diterima : 25 Oktober 2017, direvisi : 15 Mei 2018, disetujui : 30 Mei 2018

#### **Abstract**

*Aeromonas hydrophila* causes a disease that often infects fish and it is known as Motile Aeromonas Septicaemia (MAS), Hemorrhagic Septicaemia, Ulcer disease or Red-Sore disease. The aim of this study was to develop polyclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* in the rabbits to establish the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* in the fish using immunohistochemistry staining method. Preparation of polyclonal antibodies was performed using intraperitoneally injection of *Aeromonas hydrophila* with the dose  $10^9$  CPU/mL, one per week for three weeks. Blood serum was collected from auricularis vein at week 5 after the last injection. The result of antibody titer was 1280 IU/ml which measured by tube test. Subsequently, the obtained polyclonal antibody was used for immunohistochemistry staining on fish tissues with 400 times dilution. The results of the staining showed immunopositive reaction against *Aeromonas hydrophila* in the liver, skin, liver, gill, kidney, and heart of fish. To conclude, polyclonal antibody from rabbit against *Aeromonas hydrophila* can be used to establish the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* based on antigen and antibody reaction with immunohistochemistry staining.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*, immunohistochemistry, antigen, antibody

#### **Abstrak**

*Aeromonas hydrophila* menyebabkan penyakit yang sering menginfeksi ikan dan dikenal sebagai *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS), Hemorhagi Septisemia, *ulser disease* atau *Red-Sore disease*. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan poliklonal antibodi *Aeromonas hydrophila* pada kelinci untuk membantu peneguhan diagnosa Aeromoniasis pada ikan dengan metode pewarnaan immunohistokimia. Pembuatan poliklonal antibodi dilakukan pada kelinci dengan menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang telah diuji secara biokimiawi melalui injeksi intravena atau intraperitoneal. Dosis bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah  $10^9$  sel/ml sebanyak 0.5 ml pada suntikan pertama, 1 ml pada suntikan kedua, 2 ml pada suntikan ketiga dan 3 ml pada suntikan keempat. Pengambilan serum darah dilakukan pada minggu kelima setelah penyuntikan. Hasil pengukuran titer antibodi adalah 1280 IU/ml atau pada pengenceran ke-8 dengan menggunakan uji tabung. Selanjutnya antibodi pada serum digunakan untuk pewarnaan immunohistokimia dengan pengenceran 400x. Hasil pewarnaan menunjukkan reaksi immunopositif pada organ hati, kulit, limpa, insang, ginjal, dan jantung ikan terhadap antibodi *Aeromonas hydrophila*. Hal ini menunjukkan bahwa poliklonal antibodi dari serum kelinci dapat digunakan untuk memperkuat diagnosa *Aeromonas hydrophila* secara tepat berdasarkan ikatan antigen dan antibody dengan pewarnaan immunohistokimia.

**Kata kunci :** *Aeromonas hydrophila*, immunohistokimia, antigen, antibodi

#### **Pendahuluan**

*Aeromonas hydrophila* menyebabkan penyakit yang sering menginfeksi ikan dan dikenal sebagai *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS), Hemorhagi Septisemia, *User disease* atau *Red-Sore*

*disease*. Penyakit ini sering menjadi *outbreaks* pada budidaya ikan air tawar, termasuk ikan nila (Yardimci dan Aydin, 2011). Beberapa penyakit bakterial menimbulkan lesi yang sama pada organ internal dan ulser pada kulit. Bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah

bakteri gram negatif yang biasanya diisolasi dari air tawar dan merupakan habitat normal pada saluran gastrointestinal (Austin and Austin, 2007). Penyakit tersebut dapat menimbulkan kerugian ekonomis dalam suatu usaha budidaya ikan air tawar, sehingga perlu pengetahuan tentang penyakit pada ikan, cara diagnosa penyakit ikan yang tepat.

Upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah dan mengantisipasi kejadian infeksi *Aeromonas hydrophila*. adalah dengan mendeteksi penyakit tersebut secara tepat sebagai dasar untuk melakukan pengobatan, pencegahan dan pengendalian penyakit tersebut. Deteksi menggunakan *immunoassay*, metode molekuler dengan probe DNA atau PCR telah digunakan untuk mendeteksi mikroorganisme pada sampel (Zhang *et al.* 2000; Oakey *et al.*, 1999). Namun demikian, metode molekuler untuk diagnosis agen bakteri hanya dapat digunakan oleh orang yang terlatih dan prasarana yang bagus, sehingga hanya terbatas pada laboratorium tertentu. Pengembangan metode diagnosa cepat dan mudah digunakan seperti “immunoassay” berdasarkan “*monoclonal antibody*” ini sangat penting untuk mendeteksi agen penyakit dan patogenesis penyakit. Poliklonal antibodi terhadap *Aeromonas hydrophila* dapat digunakan untuk diagnosis (Korbsrisate *et al.*, 2002) seperti mempelajari peran flagella pada invasi bakteri (Merino *et al.*, 1997). Namun demikian poliklonal antibodi memberikan reaksi positif palsu dan non spesifik reaksi antigen dan antibodi terutama karakterisasi epitope dari antigen target. Sebaliknya antibodi monoklonal spesifik terhadap *Aeromonas hydrophila* telah dikarakterisasi terhadap LPS tipe 1 (Cartwright *et al.*, 1994). Diagnosa Aeromoniasis dari kolam di wilayah Daerah Istimewa Yogyakarta selama ini telah dilakukan berdasarkan perubahan pada jaringan dan isolasi identifikasi bakteri dengan uji biokimia. Perubahan patologi pada jaringan ikan

yang mengalami Aeromoniasis pada umumnya tidak spesifik hampir mirip dengan infeksi bakterial yang lain. Perubahan yang terlihat berupa hemoragi dan peradangan pada kulit dan organ internal, sehingga untuk mendukung dan memperkuat diagnosa penyakit tersebut perlu dikembangkan diagnosa yang tepat berdasarkan ikatan antigen dan antibodi pada jaringan dengan pewarnaan immunohistokimia terhadap antibodi poliklonal *Aeromonas*. Penelitian ini bertujuan mengembangkan dan memproduksi poliklonal antibodi *Aeromonas* pada kelinci untuk peneguhan kasus diagnosa Aeromoniasis pada jaringan ikan dengan menggunakan metode immunohistokimia.

### Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada pada bulan April–Oktober 2017.

Alat dan bahan yang dipergunakan adalah bakteri yang akan disuntikkan pada kelinci berasal dari ikan yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan telah dilakukan isolasi serta identifikasi secara biokemis. Media pertumbuhan bakteri, kelinci 4 ekor dengan berat 1.5-2 kg, alat nekropsi, seperangkat alat pemrosesan jaringan, media pertumbuhan bakteri, sentrifus, seperangkat alat nekropsi, spuit 1 ml, 3 ml dan 5 ml, tabung konikel, *deck glass*, *obyek glass*, *coating slide*, antibodi sekunder (Dako Envision+Dual Link System-HRP, kode K4065, USA), *phosphate buffer saline* (PBS), buffer sitrat, hematoksin, *fetal bovine serum* (FBS), mikropipet, mikrotom, binokuler mikroskop.

### Pembuatan Serum Antibodi

Pembuatan antibodi dilakukan pada kelinci dengan menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila* murni yang telah diuji secara biokimiawi. Bakteri

diperbanyak di media TSA selama 24 jam pada suhu 37°C dan dilakukan pemanenan. Bakteri dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis sebanyak 3 kali, kemudian bakteri diinaktivasi dengan 0.5% formalin selama satu malam dan pellet bakteri dipanaskan selama 2,5 jam sampai mendidih. Kemudian disentrifus dengan 3000 rpm selama 10 menit dan dibuang supernatan. Ditambahkan 5 ml PBS steril dicampur rata dengan *pipeting*. Sentrifuse 6000 rpm selama 5 menit dan dibuang supernatannya. Langkah tersebut diulang sampai 5 kali untuk menghilangkan formaldehidnya. Setelah sentrifuse terakhir dan supernatan dibuang untuk diperoleh pellet. Penghitungan bakteri dengan menggunakan metode McFarland sebanyak 10<sup>9</sup> sel/ml. Infeksi bakteri dilakukan pada 4 ekor kelinci sebanyak 0,5 ml secara intravena pada minggu ke - 1, diulang pada minggu ke-2 sebanyak 1 ml, minggu ke-3 sebanyak 2 ml dan minggu ke-4 sebanyak 3 ml secara intraperitoneal. Pengambilan darah pada minggu ke-5 dari vena telinga dan intrakardial sebanyak 10 ml, disentrifus 6000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan antisera. Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan menggunakan metode uji tabung dan uji koaglutinasi. Jika hasil titer sudah bagus atau tinggi dilakukan pemanenan keseluruhan antisera. Pemisahan protein dilakukan dengan presipitasi amonium sulfat, dilanjutkan dengan membran dialisa.

### **Pengecatan Immunohistokimia**

Prosedur kerja immunohistokimia dengan poliklonal antibodi *Aeromonas hydrophila* hasil pemanenan antisera dari kelinci yang sudah dioptimasi pengencerannya dengan antibodi sekunder serta kromogen 3-3, diaminobenzidine (DAB) (Dako Envision+Dual Link System-HRP, kode K4065, USA) dilakukan sebagai berikut: 5 ekor ikan yang didiagnosa Aeromoniasis dilakukan nekropsi dan diambil organ

kulit, hati, ginjal, jantung, insang dan limpa. Jaringan dimasukkan dalam buffer netral formalin 10% dan dilakukan pemrosesan jaringan. Potongan jaringan setebal 5 µm diletakkan pada gelas obyek, dan dideparafinisasi dalam larutan xylol dengan ulangan tiga kali masing-masing 3 menit, selanjutnya dilakukan proses rehidrasi pada larutan alkohol bertingkat (absolut selama 3 menit dengan dua kali ulangan, 95% selama 3 menit dengan dua kali ulangan, 80% selama 3 menit, 70% selama 3 menit), dicuci dengan *phosfat buffer saline* (PBS) dengan tiga kali ulangan masing-masing 5 menit. Proses antigen *retrieval methode* dengan merendam slide jaringan ke dalam buffer sitrat suhu 90-95°C (*microwave low middle*) selama 5 menit, dicuci dengan PBS dengan tiga kali ulangan masing-masing 5 menit. *Blocking endogenous activity* pada 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol selama 30 menit, dan dicuci dengan PBS+ tween 20 dengan tiga kali ulangan masing-masing 5 menit. Diinkubasi pada serum normal *Fetal Bovine Serum* (FBS) 1% selama 30 menit, dan diinkubasi dalam poliklonal antibodi terhadap *Aeromonas* selama 24 jam atau *overnight*, selanjutnya dicuci dengan PBS+ tween 20 dengan tiga kali ulangan masing-masing 5 menit. Antibodi sekunder (Dako Envision+Dual Link System-HRP, kode K4065, USA) diberikan selama 30 menit, dan dicuci dengan PBS + tween 20 dengan tiga kali ulangan masing-masing 5 menit. Substrat atau kromogen 3-3, diaminobenzidine (DAB) diberikan selama 2-5 menit kemudian dicuci pada aquades, dan *counterstain* dengan larutan hematoxylin 10 menit, dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, dilanjutkan dengan proses dehidrasi pada alkohol bertingkat (80%, 95%, absolut masing-masing 3 menit), selanjutnya proses *clearing* dalam xylol dengan ulangan tiga masing-masing 3 menit kemudian ditutup dengan gelas obyek diberi *entellan* dan diamati dengan mikroskop binokuler (Olympus Dp12).

## Analisis Hasil

Titer antibodi dari serum kelinci diukur dengan menggunakan uji koaglutinasi tabung. Hasil pewarnaan immunohistokimia dari organ ikan dianalisis secara deskriptif kualitatif. Hasil positif memberikan reaksi warna kecoklatan pada jaringan. Hal tersebut menunjukkan adanya ikatan antigen dan antibodi *Aeromonas hydrophila* pada jaringan atau organ yang diperiksa.

## Hasil dan Pembahasan

Bakteri *Aeromonas hydrophila* yang disuntikkan pada kelinci diperoleh dari ikan yang menunjukkan gejala klinis berupa hemoragi pada kulit, eksophthalmus dan hemoragi pada organ dalam. Isolasi dan identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan media pertumbuhan bakteri dan uji biokemis sampai diperoleh bakteri biak murni dari *Aeromonas hydrophila*.

Penyuntikkan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada kelinci sejumlah  $10^9$  sel/ml secara intravena dan intraperitoneal dengan perhitungan dengan metode McFarland. Tahap penyuntikkan dilakukan secara bertahap diulang sampai 4 kali selama 4 minggu. Suntikan pertama sebanyak 0.5 ml secara intravena, kedua sebanyak 1 ml, ketiga sebanyak 2 ml dan keempat sebanyak 3 ml secara intraperitoneal. Pengambilan serum darah dilakukan pada minggu ke-5 setelah penyuntikkan bakteri *Aeromonas hydrophila* dari vena aurikularis dan intrakardial sebanyak 10 cc per ekor. Selanjutnya dilakukan uji titer antibodi *Aeromonas hydrophila* dengan uji koaglutinasi tabung. Hasil pengukuran titer antibodi terhadap *Aeromonas hydrophila* adalah 1280 IU/ml atau koaglutinasi positif pada pengenceran ke-8 dengan menggunakan uji koaglutinasi tabung. Pengukuran titer antibodi tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji koaglutinasi poliklonal antibodi *Aeromonas hydrophila* pada A. Uji koaglutinasi tabung, B. Uji koaglutinasi pada gelas obyek, tampak aglutinasi berupa debris pasir berwarna putih (anak panah)

Berdasarkan uji koaglutinasi dari serum kelinci yang telah diinjeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada gelas obyek menunjukkan adanya reaksi aglutinasi positif berupa agregat debris pasir yang berwarna putih yang merupakan reaksi antigen dan antibodi. Agregat atau debris pasir putih ini dapat diamati secara langsung. Reaksi ini membutuhkan waktu yang relatif cepat antara 5-10 menit setelah

pencampuran antigen dan isolat bakteri *Aeromonas hydrophila*. Uji koaglutinasi ini merupakan tehnik diagnosa penyakit yang sangat mudah digunakan, murah, sederhana, sensitif dan tidak membutuhkan perangkat yang sulit.

Berdasarkan hasil pengukuran titer antibodi dengan menggunakan uji koaglutinasi tabung dari serum yang dipanen dari kelinci terhadap bakteri

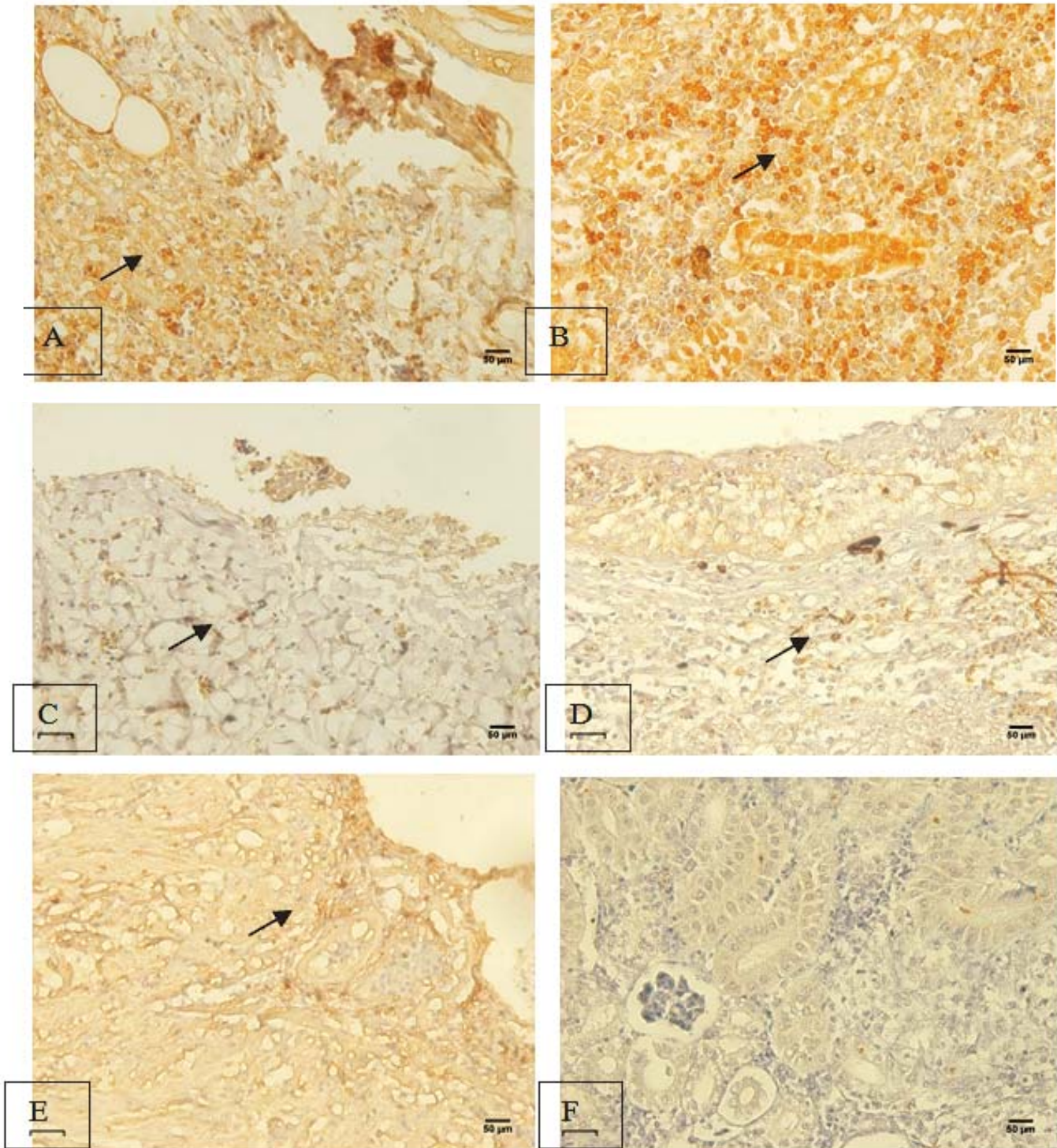


*Aeromonas hydrophila* menunjukkan hasil positif sampai pengenceran ke-8 yaitu 1280 IU/ml. Hasil ini relatif tinggi, sehingga antibodi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang ada pada serum kelinci diharapkan dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri di jaringan dengan menggunakan tehnik pewarnaan immunohistokimia. Studi tentang deteksi penyakit menggunakan metode koaglutinasi telah banyak dilakukan untuk diagnosa penyakit baik viral maupun bakterial. Deteksi penyakit yang telah menggunakan tehnik koaglutinasi adalah untuk identifikasi penyakit Anthrax. Tehnik koaglutinasi ini mempunyai kelebihan dibandingkan uji lain karena dapat digunakan dengan mudah, sensitif dan murah (Sumithra *et al.*, 2014). Tehnik ini telah digunakan untuk mendeteksi penyakit *Infectious Hematopoietic Necrosis Virus* (IHNV) yang membutuhkan waktu kurang lebih 15 menit (Boothland dan Leong, 1992). Uji koaglutinasi ini juga telah digunakan untuk deteksi bakteri penyebab *bacterial kidney disease* (BKD), furunkulosis, vibriosis dan penyakit ulser pada ikan, serta virus penyebab *infectious pancreatic necrosis* (IPN) pada ikan. Tehnik ini dapat diterapkan baik di laboratorium maupun di lapangan serta tidak membutuhkan peralatan yang terlalu sulit (Yoshimizu dan Kimura, 1985).

Antibodi poliklonal yang dihasilkan dari serum kelinci ini selanjutnya digunakan untuk deteksi bakteri di jaringan atau organ dengan tehnik pewarnaan immunohistokimia (immunodiagnosis). Jaringan atau organ ikan yang dilakukan pewarnaan immunohistokimia berasal dari ikan yang diduga mengalami infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hal ini diperkuat dari hasil isolasi dan identifikasi bakteri di Laboratorium Mikrobiologi dan proses jaringan dengan menggunakan pewarnaan Hematoxillin & Eosin (H&E). Penggunaan tehnik pewarnaan immunohistokimia ini diharapkan mampu meneguhkan diagnosa secara immunodiagnosis dan

mengetahui distribusi dari bakteri *Aeromonas hydrophila* pada jaringan atau organ ikan dengan menggunakan antibodi poliklonal *Aeromonas hydrophila*. Hasil tersebut dapat memperkuat diagnosa Aeromoniasis pada ikan dan memperoleh gambaran penyebaran infeksi bakteri pada jaringan atau organ pada tubuh ikan. Reaksi immunoreaksi positif ditunjukkan adanya warna kecoklatan pada jaringan atau organ yang merupakan reaksi ikatan antigen dan antibodi dengan pewarnaan 3-3,3-diaminobenzidine (DAB). Hasil pewarnaan immunohistokimia terhadap organ atau jaringan ikan dengan antibodi poliklonal *Aeromonas hydrophila* yang dihasilkan dari serum kelinci dapat diamati pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan adanya immunoreaksi positif terhadap antigen bakteri *Aeromonas hydrophila* pada jaringan atau organ ikan dengan antibodi poliklonal yang dihasilkan dari serum kelinci. Reaksi positif ditunjukkan adanya warna kecoklatan pada organ yang merupakan reaksi ikatan antigen dan antibodi dengan kromogen 3,3 diaminobenzidine pada organ kulit, limpa, ginjal, hati dan insang. Hal tersebut menunjukkan bahwa antigen bakteri *Aeromonas hydrophila* terdistribusi pada tubuh ikan atau berada pada organ – organ internal pada ikan. Berdasarkan hasil pewarnaan immunohistokimia tersebut menunjukkan bahwa distribusi antigen bakteri *Aeromonas hydrophila* yang paling tinggi atau banyak terdapat pada organ ginjal dan kulit ikan. Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri yang bersifat septisemia baik bakteri maupun toksin bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dihasilkan, sehingga bakteri tersebut terdapat pada beberapa organ, antara lain: insang, ginjal, hati, pankreas, limpa dan otot skeletal (Swan, L and White, M.R., 1989). Penelitian yang dilakukan oleh Coscelli *et al.*, (2014) dengan melakukan injeksi intracoelem bakteri *Aeromonas salmonicida* pada ikan turbot menunjukkan bahwa 6



Gambar 2. A. Reaksi immunopositif terhadap antibodi poliklonal *Aeromonas hydrophila* pada lapisan dermis kulit, B. Pada organ ginjal pada sel interstitial tubuli, C. Pada organ hati di bagian sinusoid hati, D. Pada bagian lamella insang, E. Pada bagian tepi jantung, (anak panah) F. Kontrol negatif pada ginjal

jam setelah infeksi antigen *Aeromonas salmonicida* berada pada pembuluh darah dan makrofag pada jantung, *ellipsoidal sheath cells* pada limpa. Reaksi positif infeksi bakteri tersebut juga berhubungan dengan foki nekrosis pada ginjal dan hati dideteksi 24

jam dan 48 setelah infeksi. Reaksi immunopositif kuat terlihat pada sitoplasma sel, sel makrofag, sel yang mengalami apoptosis. Infeksi *Aeromonas salmonicida* pada ikan turbot menyebabkan kejadian penyakit yang akut dan fatal (Farto *et al.*, 2011),



sedangkan pada infeksi kronis menunjukkan dermatitis multifokal granulomatososa (Coscelli *et al.*, 2014). Namun demikian sampai pada saat ini masih sedikit data tentang patogenesis dan patologi infeksi *Aeromonas salmonicida* pada ikan turbot.

Studi lain tentang pewarnaan immunohistokimia terhadap antigen *A. hydrophila* mengindikasikan bahwa sel-sel bakteri yang terdeteksi immunoreaksi positif terjadi pada 5 hari setelah infeksi. Distribusi antigen pada jaringan ikan nila yang diinjeksi *Aeromonas hydrophila* secara intramuskuler terlihat pada organ limfoid, hati, jantung. Intensitas pewarnaan ini akan mengalami penurunan 9 hari setelah infeksi (Moral *et al.*, 1998). Akan tetapi Lamers and De Hass (1985) menerangkan bahwa keberadaan antigen *Aeromonas hydrophila* pada hati dan ginjal masih dapat terlihat sampai 1 tahun setelah infeksi bakteri yang telah diinaktivasi dengan pemanasan.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil tersebut diatas menunjukkan bahwa antibodi poliklonal *Aeromonas hydrophila* yang dihasilkan dari serum kelinci dapat digunakan untuk mendeteksi distribusi antigen bakteri *Aeromonas hydrophila* pada organ ikan dengan tehnik pewarnaan immunohistokimia.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Pengembangan Departemen tahun anggaran 2017.

### Daftar Pustaka

Austin, B., Austin, D. A. (2007) *Bacterial Fish Pathogens : Diseases of Farmed and Wild Fish*. Fourth Edition. Springer Inc., New York. : 83-84.

Bootland, L.M., dan Leong, J.A. (1992)

Staphylococcal Coagglutination, a Rapid Method of Identifying *Infectious Hematopoietic Necrosis Virus*. *Appl. and Env. Microbiol.* : 6-13

Cartwright, G.A., Chen, D., Hanna, P.J., Gudkovs, N., Tajima, K. (1994) Immunodiagnosis of virulent strains of *Aeromonas hydrophila* associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) using monoclonal antibody. *J. Fish Disease*. 17: 123-133

Coscelli, G.A., Bermudez, R., Sancho Silva, A.R., Ruiz de Ocenda, M.V., Quiroga, M.I. 2014. Granulomatous dermatitis in turbot (*Schophthalmus maximus* L.) associated with natural *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection. *Aquaculture* 428: 111-116

Coscelli, G.A., Bermudez, R., Losada, A.P., Failde, L.D., Santos, Y., Quiroga, M.I. (2014) Acute *Aeromonas salmonicida* infection (*Schophthalmus maximus* L.). Histopathological and immunohistochemical studies. *Aquaculture* 430: 79-85

Farto, R., Milton, D.I., Bermudez, M., Nieto, T. (2011) Colonization of turbot tissues by virulent and avirulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* leucocyte strains during infection. *Dis. Aquat. Org.* 95: 167-173

Korbsrisate, S., Dumnin, S., Chawengkirttikul, R., Gherunpong, V., Eampokalap, B., Gongviseisoog, C., Janyapoon, K., Lertpocasombat, K., and Shimada, T. (2002) Distribution of *Aeromonas hydrophila* serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination. *Microbial Immunol.* 46: 875-879

Lamers C H J, De Hass M J M. (1985) Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*) *Cell Tissue Res.* 242:491-498

Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A., Tomas, J.M. (1997) The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 213-217

Moral C.H., Castillo E.F., Fierro P.L., Cortés A.V.,

- Castillo J.A., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Peralta, B.R., and Carrasco, G.N. (1998) Molecular Characterization of the *Aeromonas hydrophila aroA* Gene and Potential Use of an Auxotrophic *aroA* Mutant as a Live Attenuated Vaccine. *Infect immun* 66(5): 1813-1821
- Oakey, H.J., Gibson, L.F. and George, A.M. 1999. DNA probe specific for *Aeromonas hydrophila* (HG1). *J Appl. Microbiol.*, 86: 187-193
- Sumithra, T.G., Chaturvedi, V.K., Grupta, P.K., Siju, S.J., Susan, C., Bincy, J., Laxmi, U., Sunita, S.C., Rai, A.K. (2014) Development of Simple Method for Rapid Identification of Organism causing Anthrax by Coagglutination Test. *Biologicals* 42: 316-321
- Swan, L and White, M.R. (1989) A Guide to Approved Chemicals in Fish Production and Fishery Resource Management: Diagnosis and Treatment of *Aeromonas hydrophila* infection of Fish. Aqua Culture Extension. University of Arkansas Cooperative Extension Service.
- Yardimci, B., Aydin, Y. (2011) Pathological Findings of Experimental *Aeromonas hydrophila* Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Univ Vet Fak Derg* 58(1): 47-54.
- Yoshimizu, M. dan Kimura, T. (1985) A Coagglutination test with antibody sensitized Staphylococci for rapid and simple diagnosis of Bacterial and Viral Diseases of Fish. *Fish Pathology*, 20 : 243-261.
- Zhang, Y.L., Ong, C.T., and Leung, K.Y. (2000) Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiol*, 146: 999-1009.