

ヒラメのエドワジェラ症に対するワクチンの効果

川合研児・青山雅人

高知大学農学部栽培漁業学科 783-8502 高知県南国市物部乙200

Efficacy of Vaccine Against Edwardsiellosis of the Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Kenji KAWAI and Masato AOYAMA

Fish Disease Laboratory, Department of Aquaculture, Kochi University Monobe, Nankoku, Kochi
783-8502, Japan (E-mail: kenkawai@cc.kochi-u.ac.jp)

Abstract: Efficacy of the vaccine against *Edwardsiella tarda* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* was studied by comparing the immunizing bacterial strains of different origins and three administration methods of the vaccine. Two groups of flounder, the mean body weight was about 53 g, were immunized intraperitoneally (IP) with formalin killed cells (FKCs) of *E. tarda* HH-1 strain and EF-1 strain. The serotypes of the two strain were preliminary clarified identical. Strain HH-1 was originally isolated from a flounder, and strain EF-1 was isolated from an eel. The immunized fish and unimmunized control fish were challenged by IP injection with strain HH-1. Comparison of different administration methods was executed using fish groups (about 53 g) immunized by IP injection, oral administration and immersion with FKC of strain HH-1 and challenged by IP injection with live cells of strain HH-1. Immune response (antibody titer in the serum and phagocytic activity) was also compared between groups of different immunization methods. Additionally, the effect of encapsulation of oral administration vaccine to examine anti-acid resistance of the vaccine in the stomach was examined by immunizing fish of 86 g with FKC of strain HH-1 then challenging with live cells of the same strain. The result in the mortality in the fish immunized with strains HH-1 and EF-1 was not significantly different at 5% level, which indicates origins of the strains does not affect efficacy of the vaccine as far as the serotype is same. Both survival rate and immune response were the highest in the group of IP injection followed by oral administration and immersion. Encapsulation of the vaccine in oral administration did not show advantageous effect than the unencapsulated vaccine. It may be attributed that the capsule did not release the vaccine antigen in the gastro-intestinal tract effectively.

Key words: *Edwardsiella tarda*, Japanese flounder, vaccine, immunization, serotype

緒 言

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の増養殖では種苗生産技術が確立され、種苗生産から親魚養成までの再生産が人間の管理下で行える重要な産業となっている。しかし、様々な細菌性疾患の発生が問題となっており、なかでもエドワジェラ症は最も被害の大きな疾病である (Kusuda and Kawai, 1998)。原因菌の *Edwardsiella tarda* はグラム陰性、チトクロームオキシターゼ陰性の通性嫌気性短桿菌で、ヒラメ由来の菌株は周毛を有し、運動性を示す。症状は、肝臓や腎臓に膿瘍が形成され、腹水の貯留のために腹部が著しく膨満する。重症魚では直腸部が肛門から突出し、いわゆる脱腸状態となる。まれに眼球周囲、口腔内および鰭基部に膿瘍が形成されることもあ

る(中津川, 1983)。本症の対策として、抗生物質や合成抗菌剤の投与が行われある程度効果がみられるが、完治させることは難しい。病勢が強まってからの投薬はあまり効果が期待できない。また、発病した個体は比較的長時間生存するために、病魚の発見が遅れて投薬時期を逸することもある。さらに、感染した魚では食欲が極端に減退するため、経口投与による治療が難しい。以上のことから、本症の対策としては予防技術の確立が重要である(川合, 2000)。

予防技術として最も期待されているのはワクチンによる免疫である。しかし、本菌には分離場所や宿主などの由来により、多くの血清型あるいは変異性のあることが報告されており(Tu and Kawai, 1998)これに対処したワクチンを開発する必要がある。本症のワクチンは効果を示すという報告もあるが(馬久地, 1995)、投与方法による効果の比較など、実用化に必要なことがよく分かっていない。そこで、本研究では由来の異なる *E. tarda* の菌株で作製したワクチンの比較、およびそのうち1株で作製したワクチンを用いた各種投与方法の比較を行った。また、経口投与を行ったワクチン抗原を胃の酸から守るための対策として、カプセル(錠剤)化したワクチンの効果についても検討した。

材料および方法

供試魚

供試魚には、高知県栽培漁業センターから稚魚を入手して育成したヒラメを、高知大学海洋生物教育研究センターで飼育して用いた。菌株間の比較および免疫方法の比較には平均体重約53gのヒラメを用い、錠剤化ワクチンとホルマリン死菌(FKC)ワクチンの比較には平均体重約86gのヒラメを用いた。いずれの実験においても各区の供試尾数を25尾とした。

供試菌株

供試菌株には、1976年6月27日に静岡県袋井市養魚試験場においてウナギの腎臓から分離された *E. tarda* EF-1 株と、1988年11月30日に広島県因島市三床町沖浜でヒラメの腎臓から分離された *E. tarda* HH-1 株の2株を用いた。実験に用いるにあたり、これらの菌株はヒラメへの腹腔内注射で数回魚体通過し、強毒化したのち用いた。

FKC ワクチンの作製

HH-1 株および EF-1 株を50 mlのブレインハートインフュージョン(BHI, Difco)に接種し25°Cで8時間前培養した。つぎに、この前培養液1 mlを新鮮なBHIに接種して、25°Cで18時間、110 rpmの速度で往復振とう培養した。培養後は0.3%の濃度となるようにホルマリンを加え、25°Cで24時間不活化した。不活化した菌液は、7,000×gで15分間遠心分離してFKCを集め、使用するまで-60°Cで凍結保存した。

錠剤化 FKC ワクチンの作製

FKC ワクチンの錠剤化は、上記の方法で作製した FKC ワクチンを民間の研究所(株式会社微生物化学研究所)に依頼して行った。

免疫方法

1. 菌株間の比較 HH-1 株および EF-1 株の FKC ワクチンを用いて、腹腔内注射法で免疫し

た。注射量は体重100 gあたりFKC湿重量5 mgとなるようにPBSに懸濁して腹腔内注射した。対照区として、同量のPBSを腹腔内注射した実験区を設けた。免疫後は、水温25~27°Cで3週間飼育した。

2. 免疫方法の比較 HH-1株のFKCワクチンを用いて、腹腔内注射法、経口投与方法および浸漬法で免疫した。腹腔内注射法では、注射量は体重100 gあたりFKC湿重量5 mgをPBSで懸濁して腹腔内注射した。経口投与方法では、ドライペレットに体重100 gあたりFKC湿重量で5 mgになるように調整して吸着させたものを、自由摂餌により1週間投与した。浸漬法ではFKC湿重量の濃度が0.01 mg/mlとなるように10 lの海水に、ヒラメを10分間浸漬した。対照区として、何の処理もしない実験区とPBSを腹腔内注射した実験区を設けた。免疫後は水温25~27°Cで3週間飼育した。

3. 経口投与方法による錠剤化FKCワクチンとFKCワクチンの比較 HH-1株の錠剤化FKCワクチンおよびFKCワクチンを用いた経口投与方法で免疫した。体重100 gあたり6.25 mg (FKC湿重量として5 mg相当)の錠剤化FKCワクチンを添加・混合したモイストペレットと、体重100 gあたりFKC湿重量で5 mgのFKCワクチンを添加・混合したモイストペレットを、自由摂餌によりそれぞれ1週間投与した。免疫後は水温15~21°Cで3週間飼育した。

攻撃試験

HH-1株を25°Cで18時間静置培養した生菌を用い、注射法と浸漬法では免疫3週間後、経口投与方法では投与を開始して4週間後に腹腔内注射法で攻撃した。すなわち、菌株間の比較および免疫方法の比較では、 1.42×10^5 CFU/mlの生菌懸濁液を0.1 ml腹腔内注射し、水温24~26°Cで飼料を投与しながら2週間飼育した。錠剤化FKCワクチンとFKCワクチンの比較では、 1.56×10^7 CFU/mlの生菌を0.1 ml腹腔内注射し、水温14~16°Cで飼料を投与しながら2週間飼育して観察した。実験中に死亡した魚の腎臓から菌分離を行い、分離菌が抗*E. tarda* EF-1株血清に凝集することを確認した。

感染率の測定

2週間の攻撃試験観察期間終了後に、生残したすべての魚から菌の分離を行い、分離された場合には抗血清の凝集反応で*E. tarda*であることを確認した。各実験区の感染率は、死亡魚数と菌が分離された生残魚の数を合計して求めた。

血中凝集抗体価の測定

免疫を開始して4週間後に、各実験区の魚の尾部静脈から血液を採取して凝固させたのち、 $1,500 \times g$ で10分間遠心分離して得た上清を血清として採取した。その後、HH-1株のFKCを反応抗原として用いたマイクロタイター法により凝集抗体価を測定した。

頭腎マクロファージの貪食活性

1. 蛍光ラテックスビーズ懸濁液の調製 900 μ lのMEM培地に対して、蛍光ラテックスビーズ (Fluospheres, 1.0 μ m, yellow green, 2% solids; Molecular Probes) を100 μ l加えて10倍に希釈し、蛍光ラテックスビーズ懸濁液とした。

2. Fluorescein isothiocyanate (FITC) 蛍光染色細菌懸濁液の調製 PBS 10 mlに 1.42×10^8 CFU/mlの濃度に菌を懸濁し、FITC (和光純薬工業) を5 mg加え、室温で30分間スターラーを

用いてかくはんした。その後、 $5,500\times g$ 、5分間遠心分離して菌に吸着していない FITC を除去したものを再懸濁し、FITC で染色した生菌懸濁液とした。

3. 頭腎細胞懸濁液の調製 免疫を開始して4週間後の各実験区の実験魚から頭腎を採取し、イーグル MEM 培地（日水製薬、以下 MEM）で洗浄したのち、1 ml の MEM 中で頭腎をハサミで細片化した。5分間放置した上清を $1,500\times g$ で2分間遠心分離した。沈殿として得た細胞を1 ml の MEM で3回洗浄したのち、同培地に懸濁したものを頭腎細胞懸濁液とした。

4. 頭腎マクロファージの貪食活性の測定 24穴プレートに100% エタノールでよく拭いたカバースリップを入れ、頭腎細胞懸濁液 $100\ \mu\text{l}$ をカバースリップの上に置き、 25°C で30分間培養した。つぎに、MEMで3回洗浄し、カバースリップに付着していない細胞を除き、付着した細胞をマクロファージとして使用した。これに蛍光ラテックスビーズ懸濁液または FITC 染色細菌懸濁液を $500\ \mu\text{l}$ 加え、 25°C で1時間培養して貪食させた。そして、MEMで5回洗浄し、貪食されていない蛍光ラテックスビーズまたは細菌を取り除いた。洗浄したカバースリップの上に、細胞形状保護のための非動化ウシ胎児血清を1滴置いて風乾したのち、 -20°C のエタノールを加えて1分間固定し、精製水で3回洗浄後再び風乾した。乾燥後、ギムザ染色液（Merck）を PBS で5倍に希釈した溶液で30分間染色し、精製水で十分に洗浄して風乾した。風乾したカバースリップはスライドガラスにマニキュアを用いて接着し、蛍光顕微鏡で観察し、貪食率および貪食指数を測定した。

有意差検定

生残率と頭腎マクロファージの貪食活性の測定について、免疫区と対照区との間の平均値の差の有意性を Student *t*-test によって調べた。

結 果

菌株間の比較

由来の異なる2つの株のFKC ワクチンを注射して免疫したのち、攻撃試験を行って効果を比較した結果を Table 1 に示す。対照区では5日後から急に生残率が低下したが、免疫した2つの

Table 1. Survival and infection rates after challenge in the fish immunized by IP injection with FKC of HH-1 and EF-1 strains.

	Immunization		
	FKC of HH-1	FKC of EF-1	PBS control
Survival rate (%)	96 *	84 *	24
Infection rate (%)	64 *	60 *	100

*Significantly different from the PBS control group by Student *t*-test ($P < 0.05$).

区では生残率が低下しなかった。最終的な生残率は、免疫した2区のうち HH-1 株の区が96%、EF-1 株の区が84% および対照区が24% となり、両免疫区と対照区との間で5%の有意水準で有意差が認められた。しかし、両株の間では生残率に有意差が認められなかった。感染率は、免疫区では HH-1 株の区で64% および EF-1 株の区で60% であったのに対し、対照区では100%であった。また、両免疫区間では有意差が認められなかった。

免疫して4週間後に平均血中凝集抗体価を調べた結果を Table 2 に示す。HH-1 株の区で11、

Table 2. Antibody titer in the serum and phagocytic activity of head kidney leucocytes in the fish 4 weeks after immunization by IP injection with FKCs of HH-1 and EF-1 strains.

	Immunization		
	FKC of HH-1	FKC of EF-1	PBS control
Serum antibody titer (Log ₂)	11	10.7	<2
Phagocyte rate against latex beads (%)	40.3±1.5	41.1±2.5	21.0±3.0
Phagocytic index against latex beads (bacteria/cell)	1.7±0.0	1.8±0.3	1.1±0.1
Phagocyte rate against bacterial cells (%)	54.3±9.1	48.0±6.9	24.0±2.0
Phagocytic index against bacterial cells (bacteria/cell)	2.0±0.1	1.8±0.1	1.2±0.1

Values of phagocyte rate and phagocytic index in the HH-1 FKC and EF-1 FKC groups were significantly different from those of the PBS control group by Student *t*-test ($P < 0.05$).

EF-1 株の区で10.7と高い値を示したのに対し、対照区ではまったく凝集しなかった。頭腎マクロファージ貪食活性の結果については、ラテックスビーズおよび生菌を貪食させた場合のいずれでも、免疫した2つの区では、貪食率・貪食指数ともに対照区より高い値を示し、5%の有意水準で有意差が認められた。平均血中凝集抗体価および頭腎マクロファージの貪食活性のいずれにおいても、EF-1 株と HH-1 株の両区の間には有意差が認められなかった。

免疫方法の比較

HH-1 株の FKC ワクチンを用いて、各種投与方法で免疫を行ったときの効果を比較した結果は以下のとおりである。攻撃後の生残率は注射法、経口投与方法、浸漬法の順で高い値を示した (Table 3 および Fig. 1)。いずれの投与方法でも対照区に対して5%の有意水準で有意差が認められた。感染率も注射法、経口投与方法、浸漬法の順で低い値を示し、注射法で64%および経口投与方法で76%であったが、浸漬法では96%と高い値を示した。

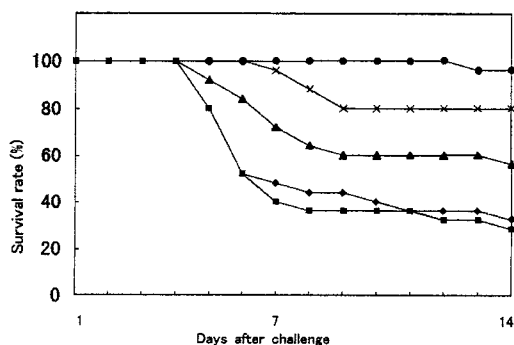


Fig. 1. Survival rate after challenge in the flounder immunized by different vaccination methods. ●, IP injection; ×, oral administration; ▲, immersion; ■, PBS injection control; ◆, non-treated control.

Table 3. Survival and infection rates after challenge in the fish immunized by three methods with FKC of HH-1 strain.

	Immunized			Control	
	IP injection	Oral administration	Immersion	PBS injection	Untreated
Survival rate (%)	96*	80*	56*	24	24
Infection rate (%)	64	76	96	100	100

*Significantly different from the untreated control by Student *t*-test ($P < 0.05$).

免疫した4週間後に、血中凝集抗体価ならびに頭腎マクロファージの活性を測定した結果は以下のとおりである。平均血中凝集抗体価は注射法で11、経口投与法で3、浸漬法で2となり、注射法で高い値を示した (Table 4)。頭腎マクロファージの貪食活性のうち貪食率は、ラテックスビーズと生菌のいずれを貪食させた場合にも、免疫区は対照区よりも高い値を示し、すべて5%の有意水準で有意差が認められた。免疫区の中では、注射法で免疫した場合で最も値が高く経口投与法および浸漬法で免疫した場合はほぼ同程度の値を示した。また、免疫区ではラテックスビーズを貪食させた場合よりも生菌に対してやや高い値を示した。貪食指数でも、ラテックスビーズと生菌のいずれを貪食させた場合でも、免疫区では対照区よりも一度に多くの粒子を貪食し、5%の有意水準で有意差が認められた。免疫区においてラテックスビーズと生菌を貪食させた場合の間では有意差が認められなかった。

Table 4. Antibody titer in the serum and phagocytic activity of head kidney leucocytes in the fish 4 weeks after immunization by three methods with FKC of HH-1 strain.

Immune response	Immunizide			Control	
	IP injection	Oral administration	Immersion	PBS injection	Untreated
Serum antibody titer (Log ₂)	11	3	2	<2	<2
Phagocyte rate against latex beads (%)	40.3±1.5*	35.5±3.1*	36.3±1.5*	21.0±3.0	22.6±0.6
Phagocytic index against latex beads	1.7±0.0*	1.8±0.2*	1.6±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1
Phagocyte rate against bacterial cells (%)	54.3±9.1*	45.0±3.6*	42.6±2.3*	24.0±2.0	24.8±2.8
Phagocytic index against bacterial cells	2.0±0.1*	1.8±0.1*	1.6±0.1*	1.2±0.1	1.3±0.1

*Significantly different from the untreated control by Student *t*-test ($P < 0.05$).

錠剤化ワクチンとFKCワクチンの経口投与法における比較

錠剤化ワクチンとFKCワクチンで免疫したのち、攻撃試験を行った結果をTable 5に示す。最終的な生存率は、錠剤化ワクチンの区では20%であったのに対してFKCワクチンの区では52%となり、錠剤化ワクチンよりもFKCワクチンの効果が高かった。しかし、両区とも対照区に対する有意差は認められなかった。感染率は両免疫区とも比較的高かったが、錠剤化ワクチンで96%およびFKCワクチンで80%となり、感染率においても、錠剤化ワクチンよりもFKCワクチンのほうが低い値を示した。

Table 5. Survival and infection rates after challenge in the fish immunized by oral administration with capsulated FKC and uncapsulated FKC vaccines.

	Capsulated vaccine	Uncapsulated FKC	Control
Survival rate (%)	20	52	8
Infection rate (%)	96	80	100

免疫4週間後に、血中凝集抗体価ならびに頭腎マクロファージの貪食活性を測定した結果は以下のとおりである。平均血中凝集抗体価は錠剤化ワクチンの区が1.3であったのに対してFKCワクチンの区が3.5となり、FKCワクチンのほうが高い値を示した (Table 6)。貪食率および貪食指数においても、錠剤化ワクチンよりもFKCワクチンのほうが高い値を示した。

Table 6. Serum antibody titer and phagocytic activity of head kidney leucocytes in the fish 4 weeks after immunization oral administration with capsulated FKC and uncapsulated FKC vaccines.

	Capsulated vaccine	Uncapsulated FKC	Control
Serum antibody titer (Log ₂)	1.3	3.5	<2
Phagocyte rate against latex beads (%)	20.7±2.6*	34.1±8.9*	15.2±2.3
Phagocytic index against latex beads (bacteria/cell)	1.4±0.1	1.6±0.3	1.5±0.3
Phagocyte rate against bacterial cells (%)	21.2±4.3*	54.9±5.1*	14.8±1.9
Phagocytic index against bacterial cells (bacteria/cell)	2.2±0.1*	3.2±0.4*	1.6±0.1

*Significantly different from the control by Student *t*-test ($P < 0.05$).

考 察

本研究では、本症ワクチンの実用化に向けた研究として、まず由来が異なる *E. tarda* の菌株で作製したワクチンの比較について検討した。HH-1 株および EF-1 株の両菌株間には、生残・感染率、血中凝集抗体価ならびに頭腎マクロファージの貪食活性のどの実験においても、有意差がみられなかった。ヒラメ由来の HH-1 株とウナギ由来の EF-1 株は、株の由来以外は、性状および血清型が同様な菌株である。このことから、FKC ワクチンの効果は対象となる病原菌と血清型が同様な菌の FKC ワクチンであれば株の由来は問題とされないと考えられる。

つぎに、本研究では HH-1 株で作製した FKC ワクチンを用い、各種投与法の効果について比較した。生残率に基づいて効果を判定すると、注射法の効果が最も高く、次いで経口投与方法、浸漬法の順であった。また、感染率においても注射法および経口投与方法が60%程度であったのに対して、浸漬法ではほぼ100%の個体が感染していた。免疫した実験区では比較的高い生残率が得られたが、攻撃後の感染率はどの実験区でも高かった。*E. tarda* はウナギの好中球の食作用に抵抗性を持つこと (飯田ら, 1993)、およびヒラメの好中球中でも増殖すること (Miyazaki and Kaige, 1985) が報告されている。このことから、*E. tarda* はヒラメの貪食細胞の食作用に対しても抵抗性があり、攻撃試験後でも感染率が高く測定されたのではないかと考えられる。感染率で示されたこのような生菌がその後増殖して、再びヒラメの発病に至る可能性は否定できない。しかし、一般的に今回のような攻撃実験では、再び死亡が始まる例がほとんどない。したがって、これらの生残菌もヒラメの貪食細胞とのせめぎ合いの中で徐々に消滅するものと考えられる。

血中凝集抗体価では注射法だけが高く、経口投与方法と浸漬法で免疫した区が低い値を示した。Lumsden *et al.* (1994) はニジマス *Oncorhynchus mykiss* を細菌性鰓病の原因菌 *Flavobacterium branchiophilum* のアセトン不活化ワクチンで免疫したときに、注射法で免疫した場合には血中で

最も高かったが、浸漬法で免疫した場合には鰓をホモジナイスした試料中で最も高くなったと報告している。また、浸漬法で感染実験を行った場合には、浸漬法による免疫が最も効果的であったとしている。本研究において、浸漬法による免疫の効果が低かったのは攻撃方法が注射法であったため、浸漬法で攻撃すれば浸漬免疫においてもより高い効果が得られた可能性が考えられる。しかし、馬久地ら（1995）は免疫したヒラメで、浸漬法により感染実験を行った場合には、注射法による免疫のほうが浸漬法による免疫よりも高い効果を示したと報告している。このことから、今回の結果はやはり免疫方法として注射法が最も高い効果を示すと考えられる。

ワクチン抗原を胃の酸から守るため、錠剤化したFKCワクチンの効果を検討した結果、錠剤化したワクチンの効果が低かった。この理由として攻撃実験での感染が強すぎたため（対照区の生残率が8%）に、効果の差が現れにくかった可能性が考えられる。しかし、錠剤化したワクチンは生残率、感染率、血中凝集抗体価、頭腎マクロファージの貪食活性のいずれの測定項目においても、錠剤化していないFKCワクチンより効果が低かった。この原因として、錠剤化する際に用いた賦型剤の主成分である酵母がワクチンの効果を阻害した可能性が考えられる。しかし、Ashida *et al.* (1998) など多くの報告があるように、酵母はワクチンと混合して使用することにより免疫効果を向上させる例が多く、賦型剤に混合された酵母が原因であったとは考えにくい。おそらく、錠剤化する際の加熱などの条件により抗原性が低下したか、賦型剤の混在によって、腸内で抗原が十分に遊離・吸収できる状態になっていなかったかのいずれかが原因になったものと考えられる。今後、カプセルあるいは錠剤化を行う際には、このような点について十分に検討しなければならない。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金、基盤研究(B)課題番号(11460090)の助成によった。

文 献

- ASIDA, T., E. OKIMATSU, M. UI, M. HEGURI, Y. OYAMA and A. AMEMURA, 1998. Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* against experimental edwardsiellosis by oral administration of immunostimulants. *Fisheries Science*, **65**(5), 527-530.
- 飯田貴次・三浦 薫・若林久嗣・小林正典, 1993. アクリジン・オレンジ染色によるウナギ好中球細胞内殺菌活性の測定. 魚病研究, **28**, 49-50.
- 川合研見, 2000. ヒラメのエドワジェラ症. 養殖, 2000年9月号, 82-83.
- KUSUDA, R. and K. KAWAI, 1998. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.*, **33**(4), 221-227.
- LUMSDEN, J., V.E. OSTLUND, D.D. MACPHEE and H.W. FERGUSON, 1994. Production of gill-associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunization with acetone-killed *Flavobacterium branchiophilum* and the relationship to protection from experimental challenge. *Fish & Shellfish Immunol.*, **30**(5), 151-165.
- 馬久地隆幸・清水智之・本多数充・中井敏博・室賀清邦, 1995. エドワジェラ症に対する予防免疫の試み. 魚病研究, **30**(4), 251-256.

- MIYAZAKI, T. and N. KAIGE, 1985. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathol.*, **20**(2-3), 219-227.
- 中津川俊雄, 1983. ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, **18**(2), 99-101.
- TU, X. and K. KAWAI, 1998. Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, **33**(5), 481-487.

(Accepted 6 December, 2000)