

Pengaruh Vaksinasi Outer Membran Protein 52 kDa Terhadap Perubahan Indeks Eritrosit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*

Effect of Vaccination Outer Membrane Protein 52 kDa on Changes in Erythrocyte Index of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Infected by *Aeromonas hydrophila*

Nanda Rino Nurrahmad¹, M. Gandul Atik Yuliani², Rahaju Ernawati³, Sri Chusniati³,
Eduardus Bimo Aksono Herupradoto², Retno Sri Wahyuni²

¹Mahasiswa, ²Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, ³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Corresponding author: nanda.rino.nurrahmad-2015@fkh.unair.ac.id

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect after being vaccinated by OMP 52 kDa *Aeromonas hydrophila* for 1 week and then infected with *Aeromonas hydrophila* 10 CFU/mL for 4 days on changes in erythrocyte index. Tilapia (*Oreochromis niloticus*) used in this study was 10-12 cm long. There were 20 tilapia (*Oreochromis niloticus*) which were divided into 4 groups, consisting of 2 control groups and 2 treatment groups which were given various types of vaccine formulations. Group P0 (-) (unvaccinated and infected), Group P0 (+) (unvaccinated and infected), group P1 (vaccinated with the whole cell protein "HydroVac®" and infected), and P2 (vaccinated with Outer Membrane Protein 52 kDa and infected) by intramuscular injection. Post-treatment blood samples were collected on day 5 post-infection, collected through a caudal puncture and then analyzed using a hematology analyzer. Post-treatment outcomes led to statistically significant changes ($p < 0.05$). Therefore, the vaccine caused a significant change in the erythrocyte index.

Keywords: *Outer membrane protein 52 kDa, Whole cell protein "HydroVac®" Aeromonas hydrophila, Erythrocyte index*

Received: 02-01-2021

Revised: 03-03-2021

Accepted: 16-05-2021

PENDAHULUAN

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri gram negatif yang biasa terdapat diperairan air tawar, air payau atau air laut. Bakteri tersebut merupakan patogen oportunistik diperairan yang memiliki tingkat virulensi yang tinggi karena memiliki *eksotoksin* jenis hemolitik dan proteolitik (Harikrishnan *et al.* 2009).

A. hydrophila dapat menimbulkan penyakit yang disebut *Motile A. Septicemia* (MAS). Penyakit akibat *A. hydrophila* dapat menyebabkan kerugian besar. Arwin dkk. (2016) menuliskan bahwa *A. hydrophila* dapat menyebabkan kematian benih ikan hingga 90%. Gejala klinis ikan yang

mengalami *Motile Aromonas Septicemia* ditandai dengan hemorragi, ascites, ulcer, *exophthalmia* dan nekrosis otot. Hemorragi dan nekrosis juga terjadi pada organ hati, limpa, ginjal ikan 96 jam pasca infeksi *A. hydrophila* dengan dosis 10 CFU/ml.

Gejala klinis tersebut diakibatkan oleh produksi enzim kitinase, lesitinase, serta toksin hemolisin. Toksin hemolisin pada *A. hydrophila* dapat melisis sel darah merah yang dapat mengurangi jumlah sel darah merah, sehingga dapat menimbulkan anemia pada ikan. Salah satu pengujian terjadinya anemia secara spesifik dapat dilihat dari indeks eritrosit. Indeks eritrosit merupakan

pengujian untuk menentukan ukuran eritrosit dan komposisi hemoglobin pada eritrosi.

Komponen Indeks eritrosit terbagi menjadi tiga, yaitu MCV, MCH dan MCHC. Nilai MCV yang merupakan ukuran rata-rata setiap eritrosit, ketika nilainya dibawah normal dinamakan mikrositik jika diatas normal disebut makrositik. MCH (*Mean Corpuscular Haemoglobin*) merupakan jumlah rata-rata hemoglobin pada setiap eritrosit, jika nilai MCH dibawah normal maka juga terjadi penurunan pasokan oksigen. Karena oksigen dibawa oleh hemoglobin darah kemudian disalurkan ke seluruh tubuh. Sedangkan nilai MCHC (*Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration*) merupakan nilai konsentrasi hemoglobin dibanding hematokrit. Pada indeks eritrosit data menggambarkan ikan keadaan anemia secara morfologi pada eritrosit, dan juga bisa merepresentasikan abnormalitas pada eritrosit yang dikarenakan perdarahan atau anemia.

Penentuan Anemia secara morfologi yaitu normositik normokromik, makrositik normokromik, makrositik hipokromik, mikrositik hipokromik (Bijanti dkk, 2010). Klasifikasi anemia dapat ditentukan dari pemeriksaan indeks eritrosit. Indeks eritrosit merupakan pengujian yang dapat merepresentasikan ukuran eritrosit dan konsentrasi hemoglobin. Konsentrasi hemoglobin dalam darah berkaitan dengan keadaan eritrosit. Jika eritrosit lisis akan terjadi penurunan nilai hemoglobin (Greer *et al*, 2013).

Pencegahan infeksi bakteri *A. hydrophila* antara lain dengan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik sebagai pencegahan infeksi *A. hydrophila* sudah banyak mengalami resistensi antibiotik (Orozova *et al*, 2010). Pencegahan lain yang dapat dilakukan terhadap MAS adalah dengan vaksinasi (Galina *et al*, 2009).

METODE

Bahan-bahan yang digunakan adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*), pakan ikan dalam bentuk pellet, air isi ulang, isolat *A. hydrophila* media TSB, media TSA, vaksin *whole cell* dengan merk dagang *HydroVac®*, *freund's adjuvan complete, outer membran Protein 52 kDa A.*, larutan NaCl fisiologis, Antikoagulan EDTA. Peralatan

Hewan coba yang akan digunakan adalah 20 ekor ikan nila (*O. niloticus*) dengan berat rata-rata 40 gram dan panjang 10-12 cm. Ikan nila secara acak dibagi menjadi 4 grup perlakuan (P0(-), P0(+), P1 dan P2) dan lima kali ulangan. Ikan nila diadaptasikan dalam akuarium dalam 35 liter air selama 7 hari. Kelompok perlakuan P0(-) dan P0(+) diinjeksi dengan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 0,1 ml, kelompok perlakuan P1 divaksin dengan *Whole cell* vaksin merk dagang "*HydroVac*" sebanyak 0,1 ml dan kelompok perlakuan P2 divaksin dengan *Outer Membrane Protein 52 kDa* ditambah adjuvant *freund's adjuvan complete* dengan dosis 10µg sebanyak 0,1 ml.

Ikan nila diinkubasi dalam akuarium selama 7 hari. Kemudian pada hari ke 8 pasca vaksinasi seluruh kelompok perlakuan diinfeksi bakteri *A. hydrophila* CFU/ml sebanyak 0,1 ml kecuali kelompok perlakuan P0(-) yang diinjeksi NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 0,1 ml, 5 hari setelah infeksi ikan di eutanasi dan ambil sampel darah sebanyak 0,5 ml dengan teknik *caudal vena punctie* kemudian darah ditambah antikoagulan EDTA lalu dilakukan pengujian indeks eritrosit menggunakan hematology analyzer. Kemudian datanya dihitung dengan *Oneway Anova*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan gejala klinis

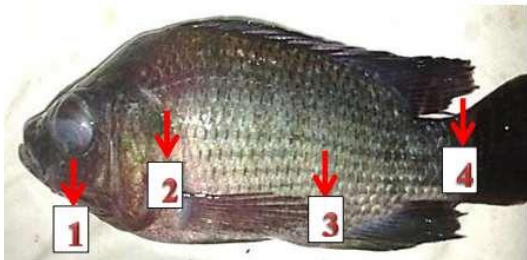
Pengamatan gejala klinis ini dilakukan sebelum pengambilan darah



Gambar 1. Ikan PO- tidak menunjukkan gejala klinis (Dokumentasi Pribadi, 2018)



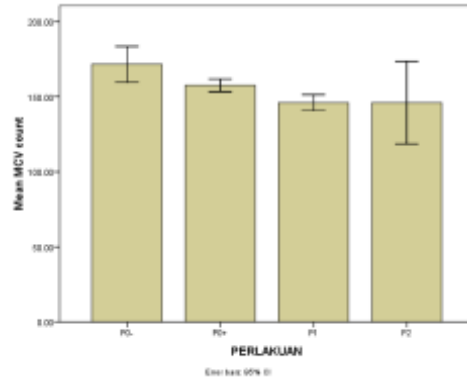
Gambar 2. Ikan PO(+) menunjukkan gejala klinis. Keterangan: (1) Exophthalmia (2) Hemoragi (3) Dropsy pada rongga abdomen (4) sirip dan ekor gerimpis (Dokumentasi pribadi, 2018)



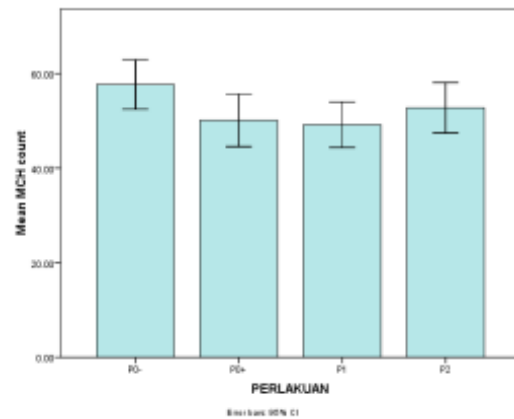
Gambar 3. Perubahan patologi anatomi pada perlakuan P1. Keterangan: (1) Exophthalmia (2) Hemoragi (3) Dropsy pada rongga abdomen (4) sirip dan ekor gerimpis (Dokumentasi pribadi, 2018)



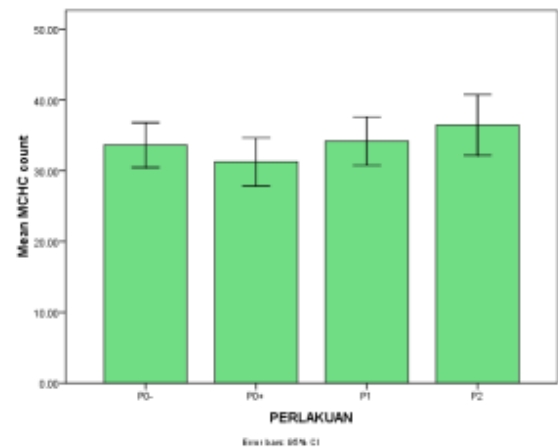
Gambar 4. Ikan nila pada perlakuan P2 tidak menunjukkan gejala klinis. (Dokumentasi Pribadi, 2018)



Gambar 5. Grafik nilai MCH Ikan Nila Setelah Perlakuan



Gambar 6. Grafik nilai MCH Ikan Nila Setelah Perlakuan



Gambar 7. Grafik nilai MCHC Ikan Nila Setelah Perlakuan

dan nekropsi. Pada perlakuan PO- kondisi ikan masih dalam keadaan normal, tanpa ada gejala klinis yang terlihat (Gambar 1). Pada perlakuan PO+ ikan menunjukkan gejala klinis berupa

exophthalmia, sirip geripis, perdarahan (*haemoragi*) serta terjadi *dropsy* pada rongga abdomen (Gambar 2). Pada perlakuan P1 (Gambar 3) ditemukan gejala klinis berupa *exophthalmia*, sirip geripis, perdarahan (*haemoragi*) serta terjadi *dropsy* pada rongga abdomen mirip dengan P0+. Sedangkan P2 ikan dalam keadaan normal mirip dengan ikan kelompok P0-, ikan tidak menunjukkan gejala klinis. Gejala klinis hemoragi diakibatkan karena *A. hydrophila* memiliki enzim protease dan hemolisin sehingga dapat merusak pembuluh darah dan mengakibatkan perdarahan pada permukaan kulit ikan (Kamaludin, 2011).

Tanjung dkk. (2011) menyatakan bahwa toksin hemolisin yang menuju mata dapat merusak coroidal mata dan mengakibatkan gejala *exophthalmia*. Dropsy yang terjadi juga diakibatkan toksin hemolisin yang merusak sel darah merah sehingga protein plasma mencari daerah yang lebih rendah seperti abdomen.

Nilai Mean Corpuscular Volume

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan *Analisis of Variant* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda *Duncan* menunjukkan hasil nilai MCV pada setiap perlakuan yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Nilai MCV pada perlakuan P0+ (157,56 \pm 3,38), P1 (146,00 \pm 4,301), dan P2 (146,00 \pm 22,135) memang terlihat ada penurunan dibanding P0- (171,60 \pm 9,555). MCV yang kecil dapat diartikan sel eritrosit berukuran kecil atau mikrositik, sedangkan MCV tinggi diartikan sel eritrosit berukuran besar atau makrositik. Penurunan nilai MCV pada perlakuan yang diinfeksi dengan *A. hydrophila* (P0+, P1, P2) masih berada dalam batas normal nilai MCV yaitu berkisar antara 115 -252 fl (Dal'Bo *et al.*, 2015).

Karena nilai MCV dipengaruhi oleh hematokrit dan jumlah eritrosit. Nilai

MCV yang rendah terjadi apabila nilai hematokrit rendah dan jumlah eritrosit yang lebih tinggi atau nilai hematokrit dan jumlah eritrosit sama – sama tinggi. Ikan yang memiliki MCV rendah dan jumlah eritrosit tinggi merupakan ikan memiliki kebutuhan oksigen tinggi (Hrubec *and* Smith, 2000).

Penurunan nilai MCV juga dapat terjadi akibat peningkatan salinitas air sehingga dapat menyebabkan penurunan volume eritrosit bersama dengan peningkatan terhadap produksi eritrosit (Izergina *et al.*, 2007).

Selain itu, toksin hemolisin pada *A. hydrophila* juga dapat menyebabkan penurunan nilai MCV karena terjadi kerusakan sel darah dan keluarnya plasma darah sehingga terjadi penyusutan ukuran eritrosit. Menurut data penelitian jumlah eritrosit pada perlakuan P2 diketahui pada kisaran normal dan tidak di temukan gejala klinis perdarahan pada ikan. Sehingga, penurunan nilai MCV pada penelitian ini tidak identik dengan anemia mikrositik.

Nilai Mean Corpuscular Haemoglobin

Berdasarkan pada hasil uji Jarak Berganda *Duncan* nilai MCH, perlakuan P0- (57,68 \pm 4,21) terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan P0+ (50,10 \pm 4,47) dan P1 (49,10 \pm 3,90), sedangkan perlakuan P2 (52,74 \pm 4,28). Perlakuan P0(+) menunjukkan persamaan dengan perlakuan P1 seperti tampak pada diagram batang pada gambar 6. Hasil hitung nilai MCH dengan *Analisis of Variant* (ANOVA) terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Nilai MCH merupakan nilai yang menginterpretasikan rata-rata jumlah hemoglobin dalam eritrosit dalam satuan pikogram. Perlakuan P0- (kontrol negatif) memiliki nilai MCH paling tinggi dan pada keadaan normal, karena dijadikan sebagai patokkan ikan normal dan tidak diinfeksi bakteri. Nilai MCH pada perlakuan P2 (vaksin OMP)

mendekati nilai P0-, Sedangkan pada kelompok P0+ (kontrol positif) dan P1 (*whole cell vaccine*) memiliki nilai MCH yang hampir sama. Nilai tersebut menggambarkan bahwa rata-rata jumlah hemoglobin eritrosit pada P2 (52,74 ±4,28) mendekati keadaan perlakuan P0- (57,68 ±4,21) dan P2 juga lebih baik dari P1 (50,10 ±4,47) atau P0+ (49,10 ±3,90).

Jumlah hemoglobin eritrosit pada perlakuan P0+ mengalami penurunan nilai yang signifikan dibanding P0- dapat diindikasikan bahwa terjadi lisis eritrosit sehingga hemoglobin keluar sel darah akibat toksin hemolisin *A. hydrophila*. Perlakuan P1 juga terjadi penurunan nilai MCH yang menurut uji Jarak Berganda *Duncan*, antara P1 dan P0+ tidak berbeda atau sama. Perlakuan P2 dengan pemberian vaksin *outer membrane protein* memiliki angka penurunan hemoglobin yang lebih kecil dibanding P0 (+) dan P1, namun mendekati nilai P0-.

Hal itu menggambarkan perlakuan P2 mengalami penurunan hemoglobin lebih sedikit saat ditantang *A. hydrophila*. Penurunan hemoglobin lebih sedikit dibanding P0(+) dan mendekati keadaan P0(-) juga dapat diindikasikan bahwa vaksin *outer membrane protein* dapat meminimalkan keadaan patologis.

Nilai Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

Hasil hitung nilai MCHC dengan ANOVA menggambarkan tidak ada perbedaan yang nyata diantara perlakuan ($P > 0,05$). Nilai MCHC pada perlakuan P0- (33,64 ±3,14), P0+(31,22 ±2,72), P1 (35,96 ±3,60), dan P2 (36,38 ±3,45). Perlakuan P2 (vaksin OMP) menunjukkan nilai tertinggi diantara perlakuan, sedangkan perlakuan P0+ merupakan nilai MCHC terendah. Perlakuan P0- dan perlakuan P1 tidak terdapat perbedaan diantara kedua perlakuan.

Nilai MCHC merupakan nilai yang menentukan konsentrasi hemoglobin dalam volume eritrosit yang dapat digunakan untuk menentukan kesehatan. Karena ikan yang lincah dan aktif bergerak memiliki nilai MCHC relatif tinggi. MCHC yang tinggi menggambarkan tingginya jumlah hemoglobin dalam darah. Ketika hemoglobin tinggi, oksigen yang diangkut lewat darah menuju organorgan tubuh juga tinggi. Oksigen yang tinggi dalam tubuh ikan dapat meningkatkan metabolisme tubuh sehingga mempercepat proses penyembuhan atau eliminasi penyakit oleh sel darah putih.

Nilai MCHC pada perlakuan P2 yang sedikit tinggi dibanding P0(-) karena toksin hemolisin pada infeksi *A. hydrophila* dapat membuat eritrosit lisis sehingga menurunkan nilai hematokrit. Kemudian ketika eritrosit lisis, hemoglobin keluar dari eritrosit lalu terakumulasi di plasma darah. Sehingga terjadi penurunan hematokrit karena eritrosit lisis oleh toksin hemolisin, sedangkan jumlah haemoglobin dalam plasma tetap membuat terjadi peningkatan nilai MCHC yang lebih tinggi. Selain itu, perlakuan P2 tidak ditemukan gejala klinis perdarahan atau dropsy seperti perlakuan P0+ dan P1. Sehingga dapat dikatakan perlakuan P2 lebih baik dari P1 dan P0+.

Berdasarkan nilai MCV dan MCH, MCHC pada setiap perlakuan dapat diketahui bahwa lima hari setelah diinfeksi *A. hydrophila* kelompok P0+ dan P1 mengalami anemia normositik normokromik. Anemia tersebut dapat disimpulkan dari penurunan MCV, MCH dan MCHC yang masih dalam batas normal. Perlakuan P2 dianggap mendapatkan hasil yang lebih baik karena tidak terjadi gejala klinis pada ikan yang diinfeksi *A. hydrophila*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian vaksinasi *outer membran protein* 52 kDa *A. hydrophila* pada ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* sel/ml mampu meningkatkan jumlah leukosit dan pada hitung jenis leukosit terdapat peningkatan jumlah limfosit.

DAFTAR PUSTAKA

- Arwin, M., F. G. Ijong, and R. Tumbol. 2016. "Characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Aquatic Science & Management.FPIK, UNSRAT. 4(2): 5255.
- Azmijah. A., M. G. A. Yuliani. 2015. Penanggulangan "Ulcer Disease" (*Aeromoniasis*) Melalui Eksplorasi Protein *Aeromonas hydrophilla* sebagai Bahan Kandidat Vaksin Sub;Unit pada Ikan Air Tawar. Surabaya: Univesitas Airlangga.
- Benli, A. C. K. dan Yavuzan. 2004. Blood Parameters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Spontaneous Infected with *Edwardsiella tarda*. Aquaculture Research. Vol.35 (14):1388-1390
- Bijanti.R, M. G. A.Yuliani, R. S. Wahyuni, R.B.Utomo.2010. Patologi Klinik Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan.Universitas Airlangga. Surabaya: Airlangga University Press.
- Dal'Bo.G.A.,F.G Sampaio, M.E Losekann, J.F de Queiroz, A.J.B. Luiz, V.H.G. Wolf, V.T. Goncalves and M.L Carra. Hematological and morphometric blood of four cultured species of economically important tropical foodfish. Neotropical Ichthyology, 13(2):439-446
- Erdem, B., E. Kariptas, E. Cil, K. Isik. 2011. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* Spp. isolated from food sample in Turkey. Turkey Journal Biology. Vol. 35:463-472.
- Fazio, F. 2018. "Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review." Elsevier B.V. Aquaculture 500. Pg: 237-242.
- Galina.J, G. Yin, L. Ardo, Z. Jeney. 2009. The use of immunostimulating herbs in fish: an overview of research.Fish Physiology and Biochemistry.Vol.35:669-676.
- Greer, J. P, A. A. Daniel, B. Glader, A. F. List, R. T. Meansjr, F. Praskevas. 2013 Wintrobe's Clinical Haematology 13th ed. Wolters Kluer. Pg: 13 -16.
- Gyuton, A. C. and J. E. Hall. 2006. Textbook of Medical Physiology.11th Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. Pg 859-864
- Hamid. NH., M. D. Hassan, Md. Sabri., A. H. Hasliza, R. H. Hamdan, M. N. F. Afifah,MS.R aina. 2016. Studies On Pathogenicity Effect Of *Aeromonas hydrophila* Infection In Juvenile Red Hybrid Tilapia *Oreochromis Sp*.LPVT. Pg.532539.
- Harikrishnan. R. ,C. Balasundaram, M. Youngsun, K. Man-Chul, K. Ju-sang,H.moonsoo. 2009. Use Of Herbal Concution In The Therapy of Goldfish Infected with *Aeromonas hydrophila*. Bull Vet Inst Pulawy.Vol. 53: 27-36.
- Herupradoto. B. A., G. A. Yuliani. 2010. "Karakterisasi Protein Spesifik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Penyakit Ulcer pada Ikan Mas." Jurnal Veteriner. Vol. 11(3):158-162.

- Izergina, E., I. Izergin, & V. Volobuev. 2007. Influence of Water Salinity on the Physiological Status and Distribution of Juvenile Chum Salmon in the Estuary of the Ola River of the Northeast Coast of the Okhotsk Sea. North pacific Andromous technical report. (7):69-71.
- Khairuman., dan Amri. 2003 Budidaya ikan nila secara intensif. Jakarta: Agromedia Pustaka. Kusriningrum, R.S.2010.Perancangan Percobaan Penelitian. Surabaya: Airlangga University Press.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko., and J.Parker. 2000. Biology of Microorganism 9th Edition PrenticeHall International Inc. USA (New Jersey).
- Mangunwardoyo. W., R. Ismayasaridan, E. Riani. 2010. Uji Patogenisitas Dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch." jurnal Ris. Akuakultur. Vol. 5(2):245-255.
- Milligan, G.N., and A.D.T. Barret.2015. Vaccinology an Essential Guide. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd. Mulia, D.S., dan C. Purbomartono. 2007. Perbandingan Efikasi Vaksin Produk Intra-dan Ekstraseluler *Aeromonas hydrophila* untuk Menanggulangi Penyakit Motile Aeromonas Septicemia pada Lele Dumbo.Jurnal Perikanan Vol.9(2):173181.
- Orozova, P., V .Chikova and H.Najdenski. 2010. "Antibiotic resistance of phatogenic for fish isolates of *Aeromoans Spp.* ." Bulgarian Journal Agriculture Science. Pg :376378.
- Olga., R.K.Rini., J. Akbar, A.Isnansetyo, dan L. Sembiring. 2007. Protein *Aeromonas hydrophila* Sebagai Vaksin Untuk Pengendalian MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) Pada Jambal Siam (*Pangasius hypophthalmus*). Jurnal Perikanan. Vol. 9(1):17-25.
- Patronov.A and I. Doytchinova. 2012. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics.Open Biology. Vol.3:120-139.
- Rashid, M.M.,M. S. Hossain and M.F.Ali.2013. "Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from silver carp and its culture environment from Mymensingh region." J. Bangladesh Agril.Vol. 11(2):373-376.
- Saanin, H. 1984. Taksonomi dan kunci identifikasi ikan. Jakarta: Bina Cipta.
- Saparinto, C.Rini susiana.2014. kiat sukses budidaya ikan nila. lily Publisher.
- Strugnell. R., F. Zepp, A. Cunningham, T. Tanta wichien. 2011. Vaccine Antigens. Elsevier. Vol. 1(1):61-88.
- Thrall, MA. 2004. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Maryland (US): Lippincott Williams and Wilkins.
- Tommasen. J., 2010. Assembly of outermembrane proteins in bacteria and mitochondria. Microbiology. Vol.156:2587-2596
- Widyastuti, D. 2011. "Kandidat Vaksin Sub unit untuk Leptospirosis." Balai Litbang P2B2 Banjarnegara. Vol.7 (2):52-54.
- Weiss, D.J and Wardrop, K.J. 2010. Schalm's Veterinary Hematology.6th Ed.Blackwell Publishing.Iowa.

Xiaoqian, T., Hongxiang, W., Fuguo, L., Xiuzhen, S., Jing, X., Wenbin, Z. 2018. Recombinant outer membrane protein T (OmpT) of *Vibrio Ichthyenteri*, A Potential Vaccine Candidate For Flounder (*Paralichthys olivaceus*).Elsevier.Vol.126:185-192.

Yardimci, B., Y, Aydin. 2011. "Patological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)."
Ankara Üniv Vet Fak Derg.Vol.58:47-54.

Yogananth. N., R. Bhagyaraj, A.Chanthuru, T. Anbalagan and K. Mullai. 2009. Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique.Global Journal of Biotechnology & Biochemistry.Vol.4 (1):51-5.
