

Levrek'lerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) İzole Edilen *Vibrio* Türlerinin API 20E Yöntemiyle İdentifikasyonu

*T. Tansel Tanrıku, Haşmet Çağırğan, Erol Tokşen

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı, 351000, Bornova, İzmir, Türkiye
*E mail: tanrikul@sufak.ege.edu.tr

Abstract: Identification of isolated *Vibrio* sp. from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) using API 20E system. A standardized and rapid identification system is offered by the API 20E system. Miniaturized multitest system was originally developed for the identification of Gram-negative enteric bacteria in clinical laboratories. During the last decade, this system has been increasingly used for the identification of marine and fresh water fish pathogens. In this study, API 20E strips were used for identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* which were isolated from cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758). Samples were taken from kidney of moribund fish and spread over the surface of tryptone soya agar (TSA) which was supplemented with 1.5% sodium chloride. The plates were incubated at 25°C for 72 hours. Colonies were purified by three times streaking on thiosulphate citrate bile salts sucrose agar (TCBS). Pure colony was passaged to NaCl added TSA before to start identification with API 20E strips. Sterile 1.5% saline water was used inoculation of bacterium to API 20E strips. Eight of isolated nine strains were *Vibrio anguillarum* one strain was *Vibrio ordalii*. Arginin dihidrolase (ADH) gelatine degradation and acid production from glukoz, mannitol, saccharose were found positive; lysine decarboxylase (LDC), ornithine decarboxylase (ODC), H₂S production, degradation of urea, acid production from rhamnose and melibiose were found negative in all *V. anguillarum* strains. Gelatine degradation, acid production from glucose, mannitol and sucrose were found positive in *Vibrio ordalii* but negative in ONPG, ADH, LDH, ODC, utilization of citrate, H₂S production, degradation of urea, TDA, indole production, VP, acid production from inositol, sorbitole, rhamnose melibiose amygdaline and arabinise were found negative.

Key Words: Vibriosis, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Dicentrarchus labrax*, API 20E.

Özet: API 20E sistemi standartize edilmiş hızlı identifikasyon için önerilen bir test sistemidir. Bu minyatür multitest sistemi klinik laboratuvarlarda Gram (-) enterik bakterilerin identifikasyonu için geliştirilmiştir. Son yıllarda bu sistemin deniz ve tatlı su balığı patojenlerinin identifikasyonunda kullanımı gittikçe artmaktadır. Bu çalışmada da kültürü yapılan levreklerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) izole edilen *Vibrio* türlerinin identifikasyonunda API 20E test kiti kullanılmıştır. Ölme üzere olan balıkların böbreklerinden sıvayla alınan numune %1.5 tuz içeren trypton soy agara (TSA) ve brain heart infusion agara (BHIA) ekilerek 21°C de 72 saate kadar inkube edildi. Koloniler thiosulphate citrate bile salts sucrose agara (TCBS) ekilerek saflaştırıldı. TCBS agarda üreyen koloniler yeniden %1.5 tuzlu TSA'ya geçildi. İdentifikasyon için API 20E test kiti kullanıldı. Bakterilerin API 20E test kiti ile inokulasyonunda steril %1.5 tuzlu su kullanıldı. İzole edilen dokuz türden sekizi *Vibrio anguillarum*, biri ise *Vibrio ordalii* olarak identifiye edildi. *Vibrio anguillarum* türleri içersinde indol testi, inositol, sorbitol, amigdalin ve arabinozdan asit üretimi temel alınarak farklı türlerin olduğu görüldü. *Vibrio ordalii* ise *Vibrio anguillarum*'dan fenotipik testler ile kolaylıkla ayrılabilirdi.

Anahtar Kelimeler: Vibriosis, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Dicentrarchus labrax*, API 20E.

Giriş

Vibriosis balıklarda en sık karşılaşılan hastalıklardan biridir. Çoğunlukla *Vibrio anguillarum*'un neden olduğu klasik vibriosis, deniz ve tatlı sularda yetiştiriciliği yapılan balıklarda ağır kayıplara neden olmaktadır. *Vibrio anguillarum*'a önceleri *Bacillus anguillarum* adı verilmiş, fenotipik ve genotipik araştırmalar sonucunda bakterinin *Vibrio* genusundan çıkarılarak *Listonella* genusuna alınmasının daha doğru olduğu bildirilmişse de (MacDonell ve diğ., 1986) bazı araştırmacılar kavram kargaşasına yol açmamak için *Vibrio anguillarum*'u kullanmayı tercih etmektedirler.

V. anguillarum denizde yetiştiriciliği yapılan somon balıklarından (Winton ve diğ., 1983; Trust, 1986), levrek, çipuranın da dahil olduğu birçok deniz balığı, kabuklulardan (Bollinches ve diğ., 1986; Çağırğan, 1993; Toranzo ve Barja, 1990) ve tatlı su alabalıklarında görülen epizootilerden izole

edilmiştir (Muroga, 1975; Giorgetti ve diğ., 1981). *V. anguillarum* hem biyokimyasal testler hem de serolojik karakterleri bakımından oldukça çeşitlilik göstermektedir. (Bryant ve diğ., 1986). Toranzo ve diğ. (1987) *V. anguillarum*'un 10 serotipinin bulunduğunu bildirmiştir. Toranzo ve Barja (1990) salmonid balıklarda serotip O1 ve O2'nin, levreklerde O1'in diğer deniz balıklarında serotip O1 ve O2'nin enfeksiyonlara neden olduğunu, diğer serotiplerin ise deniz ortamında yaygın olarak bulunduğu sonucuna varmışlardır. Grisez ve Ollevier (1995) *V. anguillarum*'un 16 serotipinin bulunduğu bildirmekle beraber Pedersen ve diğ. (1999) 7 tane daha serotipin varlığını bildirmesi serotip sayısının 23'e çıkarmıştır.

Bakteriyel hastalıkların teşhisinde patojenin çabuk ve doğru identifikasyonu önemlidir. Bu amaçla Gram (-) enterik bakterilerin identifikasyonunda API 20 E , Minitek, Micro-ID, Uni-N/F, Microtube plates ve Biolog GN adıyla bilinen

minyatür multitest identifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu identifikasyon sistemlerinin her birbirine üstünlükleri olmakla beraber çalışma prensipleri konvensiyonel biyokimyasal testler gibidir ve çok sayıda biyokimyasal testi aynı anda yürütme esasına dayanmaktadır. Test ortamları hazırlanırken büyük miktarlarda hazırlanarak kalite ve kontrollerinin dikkatle yapılması sonucunda yöntem ve testin kalite standardizasyonu gerçekleştirilmiş olmaktadır. Ancak bu sistemlerin hemen hepsi insan ve hayvanlarda görülen mezofilik patojenlere yöneliktir. Psikrofilik tatlı su ve deniz balığı patojenlerinin biyokimyasal profiline ilişkin bilgiler oldukça sınırlıdır. Evcil hayvanların ve tatlı su balıklarının bakteriyel patojenleri %0.5 tuz içeren ortamlarda iyi üreme göstermesine rağmen deniz balıklarının bakteriyel patojenlerinin identifikasyonu için tuz ilavesi gereklidir. Ayrıca mezofilik bakteriler 35-37°C'de üremesine karşın balık patojenlerinin bir çoğu psikrofilik olduğundan inkubasyon sıcaklığının 20-25°C'dir. Yukarıda saydığımız nedenlerden dolayı diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırma yapabilmek için biyokimyasal test profili çıkmış olan sistemlerin kullanılması gerekmektedir. Balık patojenlerinin identifikasyonunda en yaygın kullanılanı API 20E test stripidir (BioMerieux S.A.).

Deniz ve tatlı su balıklarının bakteriyel patojenlerinin identifikasyonunda API 20E sistemi bir çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Baudin-Laurencin, 1981; MacDonell ve diğ., 1982; Kent, 1982; Maugeri ve diğ., 1983, Romalde ve Toranzo, 1991; Biosca ve diğ., 1993; Grisez ve diğ., 1991; Kronvall ve Hagelberg, 2002)

Bakterilerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde konvensiyonel yöntemler her ne kadar referans olarak kullanılmaktaysa da besi, yerlerinin hazırlanış ve inokulasyonunda standartizasyon, laboratuvar personelinin göstereceği duyarlılığa bağlı olduğundan, her zaman mümkün olmamaktadır. Klasik yöntem maliyet açısından avantajlı gibi görüldüğü iş gücü yönünden olumsuzluklar içermektedir.

Bu araştırmada kültürü yapılan levreklerde ortaya çıkan vibriosis epizootilerinden izole edilen *Vibrio* türlerinin API 20E test kitleri kullanılarak tanımlanması amaçlanmıştır ve izole edilen *V. anguillarum* suşları fenotipik olarak karşılaştırılarak farklılıklar belirtilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bakterilerin izolasyonu 13 çiftlikten, tipik vibriosis semptomu gösteren balıkların böbreklerinden yapıldı. Bakterilerin izole edildiği çiftlikler Tablo 1'de gösterilmiştir. İzole edilen saf bakteriler, %1.5 NaCl ilave edilmiş trypton soy agarda (TSA, Oxoid) yarı yatık halde dökülerek burgu kapaklı şişelerde üzeri likit parafinle kapatılmış halde 4°C'de test edilinceye kadar saklandı.

İzolasyon hasta levreklerin böbreklerinden steril pamuklu çubukla alınarak %1.5 NaCl ilave edilmiş trypton soy agara (TSA, Oxoid) ekilmesiyle yapıldı. Ekim yapılan besi yerleri 25°C'de 72 saat inkube edildi. Primer izolasyondan sonra tipik *Vibrio anguillarum* kolonileri saflaştırmak için üç kez

thiosulphate citrate bile salts sucrose agara (TCBS, Oxoid) pasaj edildi. Pasajlar 48 saatte bir tekrarlandıktan sonra biyokimyasal testler için %1.5 NaCl ilave edilmiş TSA'ya (T-TSA) ekildi. Bakterilerde hareket muayenesi asılı damla yöntemiyle, oksidaz testi, test stripine (Merck) koloninin sürülmesiyle, katalaz testi lamda bir damla %3'lük H₂O ile koloninin karıştırılmasıyla, 0/129 (150mg)'a duyarlılık T-TSA'da yapıldı. İzole edilen *Vibrio* türlerinin tuza gereksinimleri ve toleransları %0 ve %7 NaCl tuz içeren peptonlu suda belirlendi. Bakterinin API 20E stripine inokulasyonunda saf su yerine %1.5 NaCl içeren steril su kullanıldı. Koloni homojenize edildikten sonra McFarland No: 4 yoğunluğunda standardize edildi. Stripler 25°C'de 72 saat inkube edildi. Austin and Austin (1999) tarafından bildirilen tabloya göre tanımlanıldı. Fenotipik olarak tanımlanılan bakteriler konfirmasyon için *V. anguillarum* serotip O1'e karşı (ATTC 43305) tavşanda üretilen antiserum ile lamda aglutinasyona tabi tutuldu. Antiserum ve aglutinasyon testi Toranzo ve diğ. (1987) nin belirttiği yöntemle yapıldı.

Tablo 1. İzole edilen bakterilerin izole edildikleri balık türleri ve bölgeler.

Bakteri	Balık Türü	Bölge-Yıl
<i>Vibrio</i> sp.(Ç-1)	Levrek	İzmir-Çeşme-1998
<i>Vibrio</i> sp.(Ç-3)	Levrek	İzmir-Çeşme-1998
<i>Vibrio</i> sp.(Ç-4)	Levrek	İzmir-Çeşme-1998
<i>Vibrio</i> sp.(Ç-5)	Levrek	İzmir-Çeşme-2002
<i>Vibrio</i> sp.(Ç-6)	Levrek	İzmir-Çeşme-2003
<i>Vibrio</i> sp.(K-1))	Levrek	İzmir-Karaburun-1998
<i>Vibrio</i> sp.(K-2)	Levrek	İzmir-Karaburun-1998
<i>Vibrio</i> sp.(B-1)	Levrek	Muğla-Bodrum-1997
<i>Vibrio</i> sp.(B-2)	Levrek	Muğla-Bodrum-1997
<i>Vibrio</i> sp.(M-1)	Levrek	Muğla-Milas-1997
<i>Vibrio</i> sp.(M-2)	Levrek	Muğla-Milas-1997
<i>Vibrio</i> sp.(D-1)	Levrek	Aydın-Didim-2002
<i>Vibrio</i> sp.(D-2)	Levrek	Aydın-Didim-2004

Bulgular

Hasta balıklardan izole edilen bakteriler Gram (-) kıvrık, pleomorfik, hareketli, 0/129'a duyarlı, jelatini eritme, oksidaz ve katalaz testi pozitif bulundu. Diğer izolatlardan farklı olarak Ç-6 ile D-2 %0 ve %7 NaCl içeren ortamda üreme gösterirken Ç-5 izolatu %7 NaCl içeren ortamda üredi. İzole edilen bakterilerin temel fenotipik karakterleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Bu özellikleri dikkate alınarak izole edilen bakteriler *Vibrio* genusuna ait olduğu görüldü. Bakterilerin API 20E yöntemiyle ile yapılan biyokimyasal test sonuçlarına göre bir izolat (Ç-4) *V. ordalii*, diğerleri ise *V. anguillarum* olarak tanımlandı.

Biyokimyasal testler incelendiğinde *V. anguillarum* suşları içersinde ortho-nitro-phenyl-galactoside (ONPG), sitrat kullanım ve indol testi sonuçlarında farklılıklar bulunmuş, şekerlerden inositol, sorbitol, amigdalin ve arabinoz'dan aerobik olarak asit oluşturmada farklı sonuçlar elde edilmiştir. İzole edilen *Vibrio* türlerinin API 20E identifikasyon sistemi ile yapılan biyokimyasal özellikleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Lamda termolabil antijenlerle yapılan aglutinasyon muayenesi sonucunda *V.anguillarum* suşlarının tamamının serotip O1 olduğu görüldü.

Tablo 2. İzole edilen *Vibrio* suşlarının fenotipik karakterleri.

Morfolojikve Biyokimyasal Karakterler	Ç-1	Ç-3	Ç-4	Ç-5	Ç-6	K-1	K-2	B-1	B-2	M-1	M2	D-1	D-2
Gram boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kok(K)-Basil(B)	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatini eritme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/129'a duyarlılık	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%0 NaCl'de üreme	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
%7 NaCl'de üreme	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Tablo 3 İzole edilen *Vibrio* türlerinin API 20E identifikasyon sistemi ile yapılan biyokimyasal özellikleri.

Biyokimyasal Karakterler	Ç-1 V. anguillarum	Ç-3 V. anguillarum	Ç-4 V. ordalii	Ç-5 V. anguillarum	Ç-6 V. anguillarum	K-1 V. anguillarum	K-2 V. anguillarum	B-1 V. anguillarum	B-2 V. anguillarum	M-1 V. anguillarum	M-2 V. anguillarum	D-1 V. anguillarum	D-2 V. anguillarum
ONPG	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
ADH	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
VP	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Şekerden asit üretimi													
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnositol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Sorbitol	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Rhamnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalin	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tartışma ve Sonuç

Levrek yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde ortaya çıkan vibriosiz enfeksiyonları *V. anguillarum* Serotip O1'den kaynaklanmaktadır (Grisez ve Ollevier, 1995). *V. ordalii*, nadiren de olsa hasta levreklerden izole edilmektedir (Çağırğan, 1993). Bu çalışmada izole edilen 9 suştan sadece biri (Ç-4) *V. ordalii* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat *V. ordalii*'nin tüm tipik özelliklerini göstermektedir (Tablo 4). Grisez ve diğ. (1991) API 20E ile tanımlanmış 5 *V. ordalii* suşundan 2 sinde Voges Proskauer testi'nin (VP) negatif olduğunu bildirmişse de Austin ve Austin (1999) söz konusu özelliğin negatif olduğunu bildirmiştir. *V. anguillarum* izolatlarının hepsinde arjinin dihidrolaz (ADH) VP, jelatini erime testleri pozitif; lizin dekarboksilaz (LDH), ornitin dekarboksilaz (ODC) negatif bulunmuştur (Tablo 5). *V. anguillarum* izolatlarından K-2, B-2 ve D-1 sitrat kullanımı yönünden negatif bulunurken, diğer *V. anguillarum* suşlarında pozitif bulunmuştur. Sitrat kullanımı Austin and Austin (1999),

Kent (1982) ve Maugeri ve diğ. (1983)'nin API 20E ile yapılan testlerinde *V. anguillarum*'da pozitif olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *V. anguillarum* izolatlarından 2 tanesi ONPG yönünden negatif 10 tanesinde ise pozitif bulunmuştur. ONPG testi Maugeri ve diğerlerinin (1983)in izolatlarında negatif sonuç vermiştir. ADH testinde de sadece Grisez ve diğ. (1991) de negatiftir Bu çalışmada tanımlanmış 5 *V. anguillarum* izolatlarından Ç-1, Ç-5, Ç-6, D-1 ve D-2 izolatlarında indol negatif, diğerlerinde pozitif sonuç vermektedir. Grisez ve diğ., (1991)'de de indol negatif bir grup bulunmaktadır. *V. anguillarum* türleri içerisinde biyokimyasal farklılıklar şekerlerden asit üretiminde daha çok dikkati çekmektedir. Çiftliklerden izole edilen suşlardan inositol Ç-5, Ç-6, B-2, D-1, D-2 de pozitif diğerlerinde negatiftir. Diğer araştırmacıların izolatların tümünde ise negatiftir. Sorbitol, amigdalin ve arabinozdan asit oluşturma yönünden araştırmacıların suşlarında farklılıklar görülmektedir (Tablo 5). Buna karşılık glukoz, mannitol, rhamnoz, sukroz ve arabinozun fermentasyonunda bütün izolatlar aynı sonucu

Kaynakça

- Austin B., D. A., Austin 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and Wild Fish. Praxis Publishing.
- Baudin-Laurencin F. 1981. Fish *Vibrio* strains in France. Developments in Biological Standardization 49,257-259.
- Bolinches J., A. E. Toranzo, A. Silva, J. L. Barja, 1986. Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in northwestern Spain. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 6, 1-4.
- Biosca E. G., C. Esteve, E. Garay, C. Amaro, 1993. Evaluation of the API 20E system for identification and discrimination of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2. Journal of Fish Diseases, 16,79-82.
- Bryant T. N., J. V. Lee, P. A. West, 1986. Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. Journal of Applied Bacteriology 61,437-462.
- Çağırğan H. 1993. A study on diagnosis and treatment of bacterial diseases in cultured sea bass (*Sparus aurata* L.) and sea bream (*Dicentrarchus labrax* L.). Ph.D Thesis 117
- Giorgetti, G., A. B. Tomasin, G. Ceschia, 1981. First Italian anti-vaccination experiments of freshwater farmed rainbow trout. Developments in Biological Standardization 49,455-459.
- Grisez L., R. Ceusters F. Oliever, 1991. The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. Journal of Fish Diseases 14,359-365.
- Grisez L., F. Oliever, (1995) Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology 61,4367-4373.
- Kent, M. L. 1982. Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fish using API 20E (Analytab Products) multitube test strips. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 39,1725-1729.
- Kronvall G., A. Hagelberg 2002. Numerical evaluation of minimal biochemical test combinations for the identification of *Enterobacteriaceae* species. APMIS 110. pp.451-457.
- MacDonell M. T., D. G. Swartz, B. A. Ortiz-Conde, G. A. Last, R. R. Colwell, 1986. Ribosomal RNA phlogenies for the vibrio-enteric group of eubacteria. Microbiological Sciences 3, 172-179.
- MacDonell M. T., F. L. Singleton, M. A. Hood, 1982. Diluent composition for use of API 20E in Characterizing marine and estuarine bacteria. Applied and Environmental Microbiology 44,423-427.
- Maugeri T. L., E. Crisafi, L. Genovese, M. E. R. Scoglio, 1983. Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20E system. Microbiologica 1,73-79.
- Muroga K. 1975. Studies on *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillicida* infections. Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University 14,101-105.
- Pedersen K., L. Grisez, V. R. Houdt., T. Tiainen, F. Oliever, J. L. Larsen, 1999. Extended serotyping schema for *Vibrio anguillarum* with the defination and characterization of seven provisional O-Serogroups. Current Microbiology, Vol.38,183-189.
- Romalde J. L., A.E. Toranzo 1991. Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 11, 147-149.
- Toranzo A., A. Baya, B. Roberson, J. L. Barja, D. Grimes, F. Hetrick 1987. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. Aquaculture 61,81-97.
- Toranzo A. E., J. L. Barja, 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. Diseases of Aquatic Organism 9, 73-82.
- Trust, T. 1986. Pathogenesis of the infectious diseases of fish. Annual Review of Microbiology, 40,479-502.
- Vandenbergh, J., F. L. Thompson, B. Gomez-Gil, J. Swings., 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. Aquaculture, 219,9-20.
- Winton J., J. Rohovec, J. Fryer, 1983. Bacterial and viral diseases of cultured salmonids in the Pacific Northwest. In: Crosa, J. H. (ed) Bacterial and viral diseases of fish. Washington Sea Grant. Seattle. 1-20.