

Fenotipo atípico de *Vibrio ordalii*, bacteria altamente patogénica aislada desde salmón del Atlántico cultivado en las costas marinas del sur de Chile

Atypical phenotype of *Vibrio ordalii*, a highly pathogenic bacteria isolated from Atlantic salmon reared on the marine coast of southern Chile

H Bohle^{*1}, F Kjetil², P Bustos¹, A Riofrío¹ y C Peters¹

¹ ADL Diagnostic Chile Ltda., Los Carrera 492, Castro, Chile.

² Intervet - Norbio, Thormøhlensgate 55 5008, Bergen, Noruega.

SUMMARY

During the winter and spring of 2003, Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared a sea farms along the marine coast of southern Chile, were affected by outbreaks of disease. The pathological analysis of the affected fish were characterized by the presence of skin lesions, haemorrhaging ulcers and mortality, while the internal signs included pericarditis, peritonitis, multiple necrotic foci in the liver and signs of systemic septicaemia. In all cases, pure cultures of bacteria were isolated from the lesions and internal organs. The isolated bacteria were characterized by means of conventional bacteriological identification assays, and a *Vibrio* sp. was suspected to be the agent of the disease. The final identification of the bacterial isolates was made after amplification and characterization of the 16s rRNA of the isolates using polymerase chain reaction (PCR), followed by comparison of the nucleotide sequence with previously submitted bacterial 16s rRNA sequences from a gene bank. According to the results of the analysis, the agents producing the disease were bacteria that belonged to the *Vibrio ordalii* group. However, the dissimilarities discovered by using the morphological, physiological, biochemical, enzymatic and antigenic assays did indicate important differences from the reference strains of *V. ordalii*. For this reason it is suggested that the Chilean field isolates of *V. ordalii* could be considered as an atypical biotype and/or phenotype of *V. ordalii*, although more comparative studies between the complete genomes of these bacteria are required.

Palabras clave: *Vibrio ordalii*, salmón del Atlántico, RNAr 16s.

Key words: *Vibrio ordalii*, Atlantic salmon, 16s rRNA.

INTRODUCCION

V. ordalii pertenece al grupo de los bacilos Gram negativos, curvos y flagelados, los cuales fueron reportados en el pasado como *V. anguillarum* biotipo 2 (Schiewe y col 1977). Más tarde, la bacteria fue reclasificada como *V. ordalii* debido a diferencias fenotípicas y genotípicas con respecto al clásico *V. anguillarum* (Schiewe^{ab} y col 1981). Históricamente, *V. ordalii* constituyó un problema en la salmicultura y en peces de vida silvestre en las costas del océano Pacífico de Norte América y Japón. Estudios *in vivo* revelaron que *V. ordalii* era capaz de establecer infecciones en salmón chum (*Oncorhynchus keta*), salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Actis y col 1999), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los primeros aislamientos de las bacterias en estudio fueron reportados por primera vez en Chile a mediados del 2002, y se constituyó en un gran problema durante el

2003 y 2004, afectando principalmente a salmón del Atlántico con alta morbilidad y mortalidad y que al no ser tratadas a tiempo por los equipos de salud de las empresas salmónicas podrían generar una mortalidad hasta del 100% (figura 1). Las zonas afectadas comprendieron la X, XI y XII regiones del país (cuadro 1) afectando a salmón del Atlántico cultivado en estuario y costas marinas del sur de Chile.

El presente trabajo tiene como objetivos mostrar antecedentes generales de los cuadros clínicos y la caracterización tanto fenotípica como filogenéticamente de 14 diferentes aislados bacterianos obtenidos desde salmón del Atlántico mórbidos o moribundos cultivados por 7 diferentes empresas salmónicas del sur de Chile, además de la comparación de estos aislados con otras bacterias patógenas de peces de referencia del género *Vibrio* y otros géneros relacionados en el laboratorio ADL Diagnostic Chile Ltda. (Castro, Chile) e Intervet-Norbio AS, R&D Laboratories (Bergen, Noruega).

MATERIAL Y METODOS

Anatomía patológica, histopatología y postulados de Koch. Se analizaron 14 casos clínicos de salmón del Atlántico mórbidos o moribundos (n=94) capturados con

Aceptado: 15.09.2006

*1 Fono/Fax: 56-65-250292, hbohle@adldiagnostic.cl, Casilla 160, Puerto Montt.

malla desde las balsas-jaula estuarinas y marinas de 7 diferentes empresas salmoneras distribuidas principalmente en Chiloé sur (Quellón), Puerto Aysén y Puerto Natales (cuadro 1) para análisis de anatomía patológica, histopatología, desafíos de campo, bacteriología convencional, inmunodiagnósticos y filogenética bacteriana.

Para los análisis histopatológicos, se tomaron trozos de riñón, bazo, hígado, corazón, músculos y tejido tegumentario de peces afectados, depositados en formalina al 10% en PBS, enviados y analizados en la Universidad Veterinaria del Atlántico de la isla del príncipe Eduardo (Charlottetown, Canadá).

Para completar los postulados de Koch (figura 2), se utilizaron 60 smolts de salmón del Atlántico de 100 grs promedio, previamente chequeados para enfermedades enzoóticas, a las cuales resultaron negativas incluyendo al agente actual en estudio. El primer grupo de 30 peces se desafió inoculando intraperitonealmente 1 ml de una mezcla de 3 aislados bacterianos de campo (ADL-PVA-03, 2089-03 y ADL-2027-03) a una concentración de 10^{4-5} ufc/ml, y en paralelo un grupo control de 30 peces inyectado con 1 ml de suero fisiológico. Las condiciones ambientales del desafío fueron: temperatura promedio de 12,7°C, se utilizaron 4 estanques en total con 0,25 m³ de volumen de trabajo, la densidad de cada estanque fue de 6 kg/m³, con agua a una salinidad de 20 ppm y a un flujo de 0,01 m³/hr previamente esterilizada por UV, los peces fueron alimentados *ad libitum* 2 veces al día por 45 días.

Aislados bacterianos y condiciones de cultivo. Los aislados usados en este estudio y su aplicación en varios ensayos se muestran en el cuadro 1. Los 14 aislados fueron recolectados y aislados de salmón del Atlántico clínicamente afectados. Los cultivos bacterianos se realizaron desde tejidos internos y externos en agar tripticosa de soya (TSA²) e incubados a 25°C por 48 horas.

Análisis macroscópico y microscópico de los aislados. Para determinar las características morfológicas de la bacteria, fueron tomadas colonias de los cultivos primarios de los 14 aislados y fueron cultivados en TSA 1,5% NaCl e incubados a 25°C por 48 horas. Se evaluó la forma, tamaño, color y viscosidad de las colonias bacterianas y la morfología bacteriana por tinción Gram.

Fisiología bacteriana. Para determinar la temperatura óptima de crecimiento, los 14 aislados fueron incubados en TSA 1,5% NaCl e incubados a diferentes temperaturas (0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 35 y 40°C) en un incubador refrigerado y chequeado diariamente para observar el crecimiento hasta 1 mes postincubación. Todos los aislados de campo fueron incubados por 96 horas a 25°C

Cuadro 1. Cepas de referencia y aislados de campo con sus códigos y origen utilizados en este estudio.

References and field strains with their codes and origin used for the studies.

Patógeno	Código Genbank	Región de aislamiento
<i>A. salmonicida</i> FT449	X70686	Noruega
<i>A. salmonicida</i> ADLASA	–	Chile
<i>P. salmonis</i> ADLSRS	–	Chile
<i>R. salmoninarum</i> ADL-BKD	–	Chile
<i>V. salmonicida</i> NCMB2262	<u>X70643</u>	Noruega
<i>V. anguillarum</i> 02 FT257	–	Noruega
<i>V. anguillarum</i> 02b FT618	–	Noruega
<i>V. anguillarum</i> 01 FT256	–	Noruega
<i>M. viscosa</i> RO1.0	–	Noruega
<i>V. wodanis</i> 610/95	AY628647	Noruega
<i>V. ordalii</i> DFK	AY628645	N. América
<i>V. ordalii</i> NCMB 2168	AY628646	N. América
Aislado ADL-2188-03	AY628635	Chile - X
Aislado ADL-2190-03	AY628636	Chile - X
Aislado ADL-2113-03	AY628633	Chile - XII
Aislado ADL-2193-03	AY628637	Chile - X
Aislado ADL-2027-03	AY628644	Chile - XI
Aislado ADL-2089-03	AY628632	Chile - X
Aislado ADL-2114-03	AY628634	Chile - XI
Aislado ADL-2063-03	AY628631	Chile - X
	AY530930	
Aislado ADL-2264-03	AY628638	Chile - X
Aislado ADL-INV-03	AY628642	Chile - X
Aislado ADL-PVA-03	AY628643	Chile - XII
Aislado ADL-2333-03	AY628639	Chile - X
Aislado ADL-2334-03	AY628640	Chile - X
Aislado ADL-2643-03	AY628641	Chile - X

Secuencias 16s RNAr de aislados de campo disponibles en Genbank según código de acceso.

en los medios TSA, TSA 1,5% NaCl, BHI², BHI 1,5% NaCl, Agar sangre cordero⁷, agar marino², TCBS⁵ y McConkey⁵ para determinar su capacidad de desarrollo en estos medios. Para conocer el rango de sobrevivencia de los 14 aislados en NaCl, éstos fueron desafiados con 12 diferentes concentraciones de NaCl (0,0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,8 - 1,5 - 3,0 - 6,0 - 9,0 - 12,0 - 18,0 y 24,0 grs/dl) en caldo peptona² en placas de 96 pocillos³ e incubados a 25°C por 72 horas. Al finalizar el periodo de incubación, las bacterias fueron repicadas desde los pocillos a placas de TSA para su dilución seriada e incubadas por 96 horas a 25°C, luego de lo cual se determinó su sobrevivencia por el conteo de unidades formadoras de colonia de cada concentración desafiada.

² Gibco, EUA

³ Nunc, Dinamarca

Propiedades bioquímicas. Para el análisis bioquímico, los 14 aislados de campo fueron probados en los sistemas de identificación API20E⁴ e investigación APIZYM⁴, mientras 5 aislados elegidos al azar (ADL-2264-03, ADL-2089, ADL-INV-03, ADL-2114-03, ADL-2114-03 y ADL-ACU-03) fueron analizados con el sistema API50CH⁴ para evaluar la utilización de diferentes carbohidratos y con otros *Vibrio* sp y géneros relacionados (cuadro 2).

Las colonias de los aislados de campo fueron removidas con tórula estéril de la superficie del agar y resuspendidas en medio API CHB/E⁴ (NaCl estéril fue agregado obteniendo una concentración final de 1,5% NaCl acorde con las instrucciones del fabricante. La suspensión bacteriana fue agregada a las galerías de los kits API20E, APIZYM y API50CH e incubados a 25°C (excepto *Vibrio salmonicida* y *Moritella viscosa*, 15°C). Las placas fueron analizadas después de 48 horas de incubación. Adicionalmente, se ejecutaron los test de catalasa, oxidasa⁵ y los test de susceptibilidad al factor vibriostático O129 (10 y 150 µg)⁶. La evaluación de la respiración aerobia/anaerobia fue ejecutada con medio O/F glucosa⁷.

Inmunofluorescencia indirecta y aglutinación en látex.

Los aislados de campo fueron analizados por inmunofluorescencia indirecta (IFAT) usando kits con anticuerpos monoclonales contra patógenos enzoóticos encontrados en Chile, tales como *Piscirickettsia salmonis*⁸, *Aeromonas salmonicida atípica*⁸, *Renibacterium salmoninarum*⁸, y adicionalmente, debido a la sospecha de Vibriosis, con anticuerpos policlonales contra *V. salmonicida*⁹, *Moritella viscosa*⁹ y *V. anguillarum* 01 y 02⁹, acorde con las instrucciones de los fabricantes.

Varios aislados de campo y de referencia fueron testeados con test de aglutinación en látex disponibles comercialmente¹⁰ contra *V. salmonicida*, *V. anguillarum* y *Yersinia ruckeri*. Los test de aglutinación en látex fueron ejecutados acorde con las instrucciones del fabricante de los kits.

Immunoblot (SDS-PAGE y Western Blotting). Los análisis de Western Blot fueron ejecutados usando los aislados de campo y de referencia según lo descrito por Laemmli (1970) y Grizes (1995). Brevemente, la densidad óptica de las suspensiones bacterianas fue medida a 620 nm e igualada para todos los aislados. Posteriormente,

el pellet obtenido por centrifugación (14000 rpm, 10 min) desde las suspensiones bacterianas fueron lavados con buffer TE (1 mM Tris⁵, 6 mM EDTA) y lisados por calentamiento a 100°C por 10 minutos en buffer de muestra a 2X (4% SDS, 125 mM Tris-HCl⁵, pH 6,8, 10% 2-mercaptoetanol¹¹, 10% glicerol y 0,002% azul bromofenol⁵), puestas en los pocillos de un gel de acrilamida (12%), y su peso graduado por electroforesis (Protean, BioRad) a 100V y transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un sistema Transblot (Bio-Rad). Las membranas fueron incubadas con buffer de bloqueo (3% albúmina sérica bovina en PBST) por 60 minutos seguido por 3 lavados en PBST (Tween 20¹³ al 0,05% en PBS) e incubados con anticuerpos policlonales (1:2000) hechos en conejo (Intervet-Norbio, Noruega) reactivos contra *V. anguillarum* 01, 02b (preadsorbidos con *V. anguillarum* 02a), *V. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida spp salmonicida*, *Moritella viscosa*, *V. wodanis* y *V. ordalii* por 60 minutos, luego las membranas fueron lavadas 3 veces en PBST. Para el desarrollo del color se utilizaron anticuerpos anticonejo¹² conjugados con peroxidasa del rábano picante (HRP) diluidos 1:2500 e incubados por 30 minutos, lavadas 3 veces con PBST y reveladas con tetrametilbenzidina¹³.

Amplificación del gen RNAr 16s por PCR. El procedimiento usado fue ejecutado según lo descrito por Jensen (2002). Se usaron partidores universales 27f (5'-AGAGTTTTGATC(A:C)TGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGG(C:T)TACCTTGTTACGACTT-3') para amplificar el gen que codifica el RNAr 16s. El PCR fue ejecutado en 50 µl del volumen final de reacción en tubos de PCR de 0,2 ml. Se preparó una mezcla usando *Taq* polimerasa¹⁴ y reactivos suministrados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La concentración final de la mezcla PCR fue de 10 mM TRIS-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2,5 mM Mg²⁺, 50 pmol de cada partidor, 200 µM dNTPs, 5 unidades de *Taq* polimerasa. Para cada aislado y cepa de referencia, 1 µl de colonias bacterianas no diluidas fue agregado a la mezcla de PCR. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Geneamp 9600 (Applied Biosystems, EUA). Las condiciones de termociclado usadas fueron: paso de denaturación inicial a 95°C por 5 min; 30 ciclos a 95° por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 45 seg; seguido por una extensión final de 5 min a 72°C. Después de la amplificación, el amplicón fue analizado en electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1 mg/l) y fotografiado usando el sistema UVP Digidoc-it (UVP inc, EUA).

⁴ Biomerieux, Francia

⁵ Merck, Alemania

⁶ Oxoid, Reino Unido

⁷ Linsan, Chile

⁸ BiosChile, Chile

⁹ Microtek, Canadá

¹⁰ Bionor, Noruega

¹¹ Gibco, EUA

¹² Biorad, EUA

¹³ Sigma, EUA

¹⁴ Promega, EUA

Secuenciamiento. El producto de PCR fue purificado usando columnas incluidas en el kit de purificación PCR QUIAQuick¹⁵, acorde con las instrucciones del fabricante. El secuenciamiento del producto de PCR purificado fue conducido usando los partidores 27f/1492r y 2 partidores internos: 16Sint-seq (5'-GCACCGGCTAACTC-CGTGCC-3') y 16Srev-seq (5'-CCACATGCTGCTC-CACCGCTTG-3'). Las reacciones de secuenciamiento fueron llevadas a cabo en un volumen final de 10 µl con BIG DYE 3.1 (ABI) en un secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, EUA). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y chequeadas para errores cromatográficos con el programa Sequencher v4.1.4 para Windows (GeneCodes, EUA).

Análisis filogenético. Búsquedas para genes que codifican el RNAr 16s fueron ejecutadas en bases de datos públicas usando el programa BLASTN*.

Las secuencias fueron alineadas y numeradas acorde con la secuencia casi total del gen que codifica el RNAr 16s de *V. ordalii* ATCC 33509 (número acceso: X74718). Adicionalmente a las secuencias de los 14 aislados de campo (cuadro 1), se incluyeron 18 secuencias adicionales de *Vibrio sp* (figura 4) y usadas para alineamiento de múltiples secuencias con el programa ClustalX v1.83 para Windows (Thompson y col 1997). Basado en estos alineamientos, las distancias matriciales fueron computadas en porcentajes de similitud usando la corrección de Kimura (Kimura, 1980). Finalmente, se construyó un árbol filogenético basado en esta matriz de distancias usando el algoritmo Neighbour-Joining implementado en ClustalX, el árbol filogenético fue ruteado con *V. cholerae* (número acceso: AY5135010).

RESULTADOS

Anatomía patológica e histopatología. Los centros de cultivo de los 14 casos clínicos con salmón del Atlántico evaluados en el presente estudio, se caracterizaron por afectar a peces de 80 a 1500 grs promedio y presentar una morbilidad que va desde un 5 al 40% y una mortalidad del 1 al 20% acumulado, concentrando su prevalencia en los meses de marzo a abril, debido principalmente al ingreso de los smolts de salmón del Atlántico a los centros de cultivo, disminuyendo su prevalencia con la edad y con las terapias sucesivas postingreso ya sea para Vibriosis o por otras enfermedades epizoóticas. El análisis externo de estos peces reveló la presencia recurrente de furúnculos a nivel lateral (figura 1, D) y latero-dorsal, úlceras extensivas hemorrágicas laterales (E, F), edema hemorrágico a nivel de pedúnculo, úlceras y hemorragia en base de aleta pectoral (G) y petequias a nivel del vien-

tre (figura 1, H). Internamente, los peces evidenciaron focos blanquecinos a nivel de hígado y bazo principalmente, esplenomegalia, hígado pálido (A, B) con equimosis (A) en el menor de los casos.

La histopatología reveló internamente una marcada vasculitis granulocítica subaguda multiorgánica, moderada epicarditis granulocítica edematosa subaguda y difusa. Externamente reveló una moderada a marcada dermatitis y miositis hemorrágica, granulocítica y necrotizante, subaguda y localmente extensiva.

Desafíos de campo. El grupo desafiado presentó mortalidad al noveno día con mortalidad ascendente y hasta un 100% al cabo de 45 días (figura 2), todos los peces presentaron las lesiones típicas de esta enfermedad. El grupo control no presentó mortalidad, ni lesiones hasta el día 45.

El análisis bacteriológico primario del grupo desafiado reveló la presencia del agente, en todas las lesiones externas (piel y músculo lesionados), hígado, corazón, riñón, bazo, intestino, estómago y cerebro.

CARACTERIZACION DEL AGENTE BACTERIANO

Morfología y fisiología bacteriana. Las colonias se caracterizaron por ser circulares, convexas, semiviscosas, de color gris blanquecino, sin pigmento y con un tamaño de 1 a 2 mm de diámetro. Microscópicamente, son bacilos Gram negativos, móviles, anaerobios facultativos y no esporulados. Las bacterias se desarrollaron entre los 0,3 a 3,0% de NaCl y entre los 2 a 25°C, con una temperatura óptima de 25°C. Todos los aislados de campo crecieron en TSA, TSA 1,5% NaCl, BHI, BHI 1,5% NaCl, Agar sangre cordero y agar marino, pero no se observó crecimiento en agar TCBS y Mc Conkey en todos los aislados.

Propiedades bioquímicas. Todos los aislados de campo testeados fueron sensibles al factor vibriostático O129 (10 y 150 µg), catalasa y oxidasa positivos. Los ensayos en el sistema API20E fueron positivos para la utilización de glucosa y sacarosa, variable para gelatina (36%) y negativo para el resto. En el ensayo API50CH, todos los aislados de campo mostraron ser positivos a las reacciones de glucosa, fructosa, sacarosa y trehalosa y negativos para el resto de los carbohidratos. Para el sistema de investigación APIZYM, los aislados de campo fueron positivos para fosfatasa alcalina, esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, fosfohidrolasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y variable para β-glucosidasa, todo el resto de las pruebas fueron negativas. Los resultados de los sistemas API 20E y API 50CH fueron idénticos dentro de los 14 aislados (excepto la prueba de la gelatina en API 20E donde 5 aislados de campo fueron positivos del total) y diferentes con respecto a las cepas de referencia (cuadro 2), ya sea de *V. ordalii* DFK como otros *Vibrio sp* y géneros relacionados.

¹⁵ QUIAgen, Alemania

* <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>

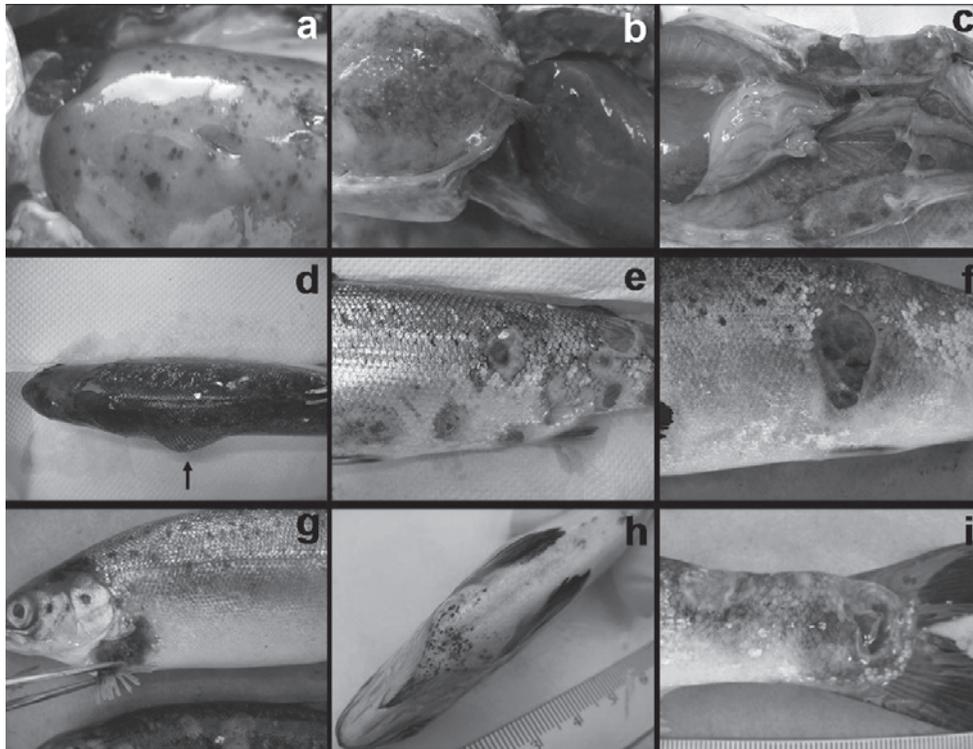


Figura 1. Signología típica en los casos clínicos analizados

(a) Hígado pálido y equimótico, (b, c) septicemia, (d, i) furúnculo (flecha), (e, f) úlceras tegumentarias sanguinolentas, (g) úlcera sanguinolenta en base aleta pectoral y (i) pedúnculo, (h) petequias en vientre.

Typical signs in the clinical cases.

(a) pale liver with echimotic haemorrhages, (b, c) septicaemia, (d) furuncle (arrow), (e, f) haemorrhaging ulcers, (g) haemorrhaging ulcer in base pectoral fin and (i) tail, (h) petechial hemorrhages in belly.

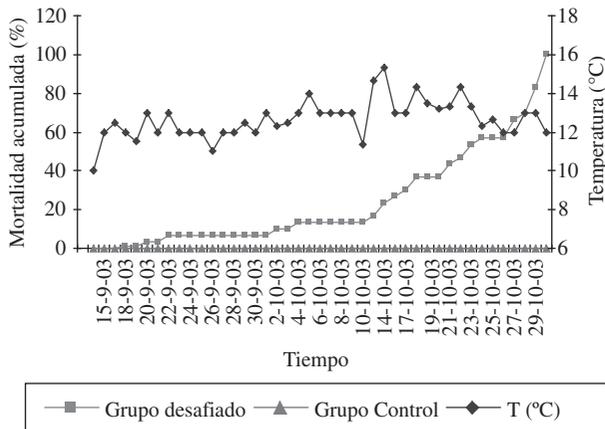


Figura 2. Desafíos de campo: (cuadrado) mortalidad acumulada de 30 peces infectados con aislados provenientes de casos clínicos (AY628644, AY628633 y AY628640), (triángulo) 30 peces control inyectada con suero fisiológico y (rombo) temperatura promedio de los estanques durante el desafío.

Field trials: (square) cumulated mortality of 30 fish infected with field isolates from clinical cases (AY628644, AY628633 y AY628640) (triangle) 30 control fish inoculated with NaCl 0.85% and (rhombus) tank average temperature during challenge.

Aglutinación en látex e inmunofluorescencia indirecta. Todos los aislados de campo fueron positivos para el test de aglutinación en látex para *V. anguillarum*, y negativos para *V. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*. Al IFAT reveló ser positivo para *V. ordalii*, débilmente positivo para *V. salmonicida*, y negativo para *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis*, *V. anguillarum serotipo 01/02* y *Moritella viscosa*.

SDS PAGE – WESTERN BLOT

Los resultados de SDS-PAGE y Western Blot mostraron que todos los antiseros no adsorbidos reaccionaron con los epítopos de los aislados de campo. Los resultados de los blots incubados con los antiseros adsorbidos mostraron reactividad contra *V. anguillarum* 02a y adsorbido con *V. anguillarum* 02b fue específico para el control positivo de cepa (figura 3, placa F), mientras algunas reacciones cruzadas fueron observadas con los antiseros de *V. anguillarum* 02b (figura 3, Placa G). En general, los aislados de campo presentaron el

Cuadro 2. Pruebas relevantes de los sistemas de identificación API 20 E y API 50CH comparando las cepas de campo y las cepas de referencia. *Mv* = *Moritella viscosa* RO 1.0, *Vs* = *Vibrio salmonicida* NCMB 2262, *Vw* = *Vibrio wodanis* 610/95, *Vo* = *Vibrio ordalii* DFK, *Va01* = *Vibrio anguillarum* serotipo 01 FT 256, *Va02a* = *Vibrio anguillarum* serotipo 02a FT 257, *Ass* = *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida* FT 449 y AC = Aislados de campo.

Relevant tests from API 20E and API 50CH identification system comparing the reference strains and the Chilean field isolates.

Prueba	Mv	Vs	Vw	Vo	Va01	Va02a	Ass	AC
número	1	1	1	1	1	1	1	14
API 20 E								
ONPG	-	-	-	-	+	+	-	-
ADH	-	-	-	-	+	+	+	-
LDH	+	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	+	+	-	-
Indol	-	-	-	-	+	+	-	-
VP	+	-	-	-	+	+	-	-
Gelatina	+	-	-	-	+	+	+	V
Glucosa	-	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	+	+	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	+	+	-	-
Sacarosa	-	-	+	+	+	+	-	+
Amigdalina	-	-	-	+	+	+	+	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	+	-	-
Oxidasa	+	+	-	+	+	+	+	+
NO ₂	+	-	+	-	-	-	-	-
API 50CH								
Ribosa	-	-	-	+	ND	ND	ND	-
Glucosa	+	+	+	+	ND	ND	ND	+
Fructosa	+	+	+	+	ND	ND	ND	+
Manosa	-	+	+	-	ND	ND	ND	-
Manitol	-	+	-	+	ND	ND	ND	-
NAG	+	-	+	+	ND	ND	ND	-
Maltosa	-	-	+	+	ND	ND	ND	-
Sacarosa	-	-	+	+	ND	ND	ND	+
Trehalosa	-	+	+	-	ND	ND	ND	+
Amigdalina	-	-	+	-	ND	ND	ND	-
Glicógeno	+	-	+	-	ND	ND	ND	-
Gluconato	-	+	-	-	ND	ND	ND	-

V = Variable, (+5/14), (+) = Positivo a la prueba, (-) = negativo a la prueba, ND = No determinado, ONPG = orto-nitrofenil-bD-galactoprianosidasa, ADH = arginina dihidrolasa, LDH = Lisina decarboxilasa, NAG = n-acetil-glucosamina.

mismo perfil de bandas entre ellas y con los anticuerpos dirigidos contra las cepas de referencia de *Vibrio* sp produjeron más bandas en las cepas de campo que con los antisueros de otros géneros no-*Vibrio* de referencia. Aun presentando bandas con los antisueros contra otras especies de *Vibrio*, las bandas de los aislados chilenos no fueron en todos los casos exactamente igua-

les a las cepas de referencias utilizadas como controles incluyendo *V. ordalii* y *V. anguillarum* de referencia, sin embargo, se observaron algunas bandas en común como por ejemplo en *V. ordalii* (figura 3, Placa D) y *V. anguillarum* 02a (figura 3, Placa G).

Análisis de las secuencias del gen 16 s RNAr. Los 14 aislados de campo presentaron la misma secuencia del gen que codifica el RNAr 16s. Este consenso fue suministrado por el análisis en BLASTN, donde el más alto score fue obtenido con *V. ordalii* cepa ATCC 33509^T (X74718), y con *V. anguillarum* cepa NCMB6 (X16895), respectivamente.

En el análisis de los alineamientos múltiples de las secuencias, varios nucleótidos divergentes fueron observados entre los aislados de campo y *Moritella viscosa*, *Aeromonas salmonicida*, *V. wodanis* y *V. salmonicida* (datos no mostrados). Las relaciones más estrechas de las cepas chilenas fueron con los grupos de *V. ordalii* y *V. anguillarum*, confirmado con la comparación de los porcentajes de similitud de las secuencias alineadas (datos no mostrados). Las secuencias del gen RNAr 16s de las cepas de campo aisladas mostraron 100% de similitud con respecto a las secuencias de referencia de *V. ordalii* incluidas en el alineamiento, seguidos por *V. anguillarum* (entre 94 a 99% similitud). Esta relación cercana entre los aislados de campo y el grupo de *V. ordalii* fue incluso observada en el árbol filogenético (figura 4).

Esta relación más cercana entre los aislados de campo y *V. ordalii* que con *V. anguillarum* se hace más obvia al evaluar las múltiples secuencias alineadas entre las regiones de nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1 a 1487. Primero, ambas secuencias parciales de los genes RNAr 16s de los aislados de campo y *V. ordalii* de referencia presentaron las bases C, T, C, T, T, G, A, C, G y A en sus respectivas posiciones 433, 1013, 1015, 1020, 1023, 1035, 1038, 1043, 1054 y 1056 de alineamiento, a diferencia de las cepas de referencia de *V. anguillarum* O1, O2a, ssp H1.11431, NCMB 2129 y NCMB 2130 que presentaron -, C, G, G, A, A, T, -, C y G, respectivamente en las mismas posiciones. Segundo, tanto los aislados de campo como las cepas de referencia de *V. ordalii* presentaron la inserción "GCACT" localizadas en las posiciones 1466-1470 del alineamiento, la cual estuvo ausente en todas las cepas de *V. anguillarum* de referencia. La región corriente, arriba a esta inserción, fue también altamente divergente entre las cepas de campo y *V. anguillarum*, pero sin diferencias con *V. ordalii* de referencia. De hecho, sólo la diferencia de un nucleótido (transversión G-T en posición 624) fue observada entre los aislados de campo y *V. ordalii* de referencia.

DISCUSION

Este estudio mostró que las bacterias aisladas de los 14 casos clínicos de diferentes zonas geográficas y que

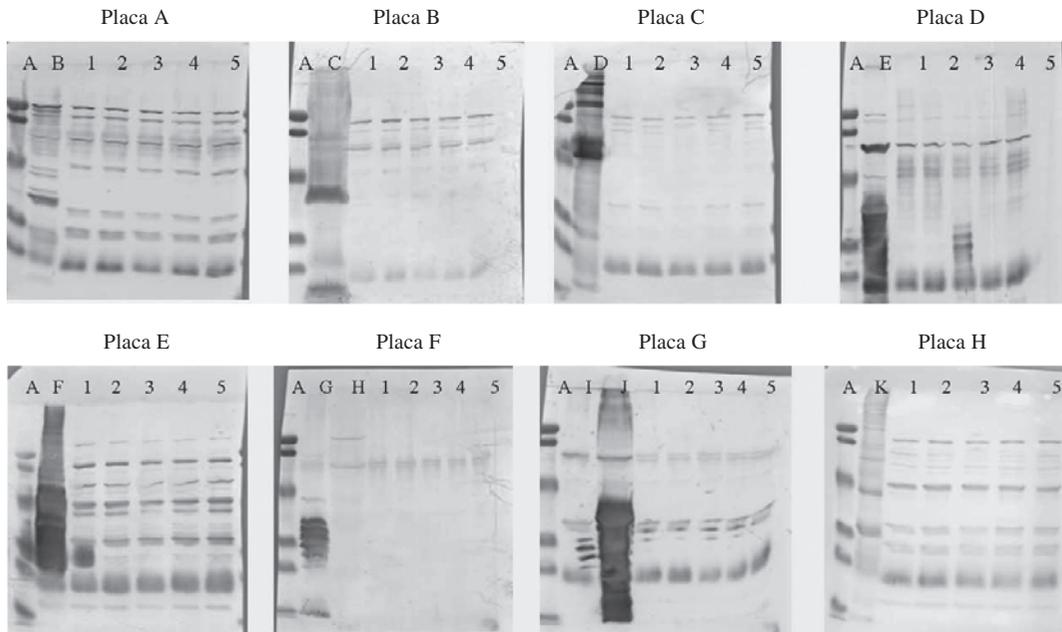


Figura 3. SDS-PAGE y western blot de células totales de 5 aislados de campo y cepas de referencia.

Línea A: en todas las placas contienen el marcador de peso molecular (BioRad) con los PM 108, 90, 50.7, 35.5, 28.6, 21.2. **La Línea B a H:** contienen los controles positivos y del 1 al 5 contienen los aislados de campo 2264, 2089, INV, 2114, y ACU, respectivamente. **Placa A:** incubada con anti-*Vibrio wodanis* (Línea B: *Vibrio wodanis* 610/95), **Placa B:** anti-*Moritella viscosa* (Línea C: *Moritella viscosa* RO 1.0), **Placa C:** anti-*Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida* (Línea D: *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida* FT449), **Placa D:** anti-*Vibrio ordalii* (Línea E: *Vibrio ordalii* NCMB 2168), **Placa E:** Anti-*Vibrio anguillarum* 01 (Línea F: *Vibrio anguillarum* ser.01 Ft 256), **Placa F:** anti-*Vibrio anguillarum* 02a (Línea G: *V. anguillarum* 02a Ft 257, Línea H: *V. anguillarum* 02b Ft 618), **Placa G:** anti-*Vibrio anguillarum* 02b (Línea I: *V. anguillarum* 02a Ft257, Línea J: *V. anguillarum* Ft618), **Placa H:** anti-*Vibrio salmonicida* (Línea K: *Vibrio salmonicida* NCMB 2262).

SDS-page and western blotting of whole cells of five Chilean field isolates and reference strains.

Lane A: on all the plates contain the molecular weight marker (BioRad, batch 96270) with the following molecular weight (MV): 108, 90, 50.7, 35.5, 28.6, 21.2. **Lane B** through H: contain the positive references while lane 1-5 contain the Chilean field isolates (Lane 1: Chilean field strain (ADL-2264-03), Lane 2: Chilean field strain (ADL-2089-03) Lane 3: Chilean field strain (ADL-INV-03) Lane 4: Chilean field strain (ADL-2114-03), Lane 5: Chilean field strain (ADL-PVA-ACU)) respectively. **Plate A:** anti *Vibrio wodanis* antiserum. Lane A: *Vibrio wodanis* (strain: 610/95). **Plate B:** *Moritella viscosa* antiserum. Lane C: *Moritella viscosa* (strain RO1.0). **Plate C:** *Aeromonas salmonicida* subs. *salmonicida* antiserum. Lane D.: *Aeromonas salmonicida* subs. *salmonicida* (strain FT449). **Plate D:** *Vibrio ordalii* antiserum. Lane E: *Vibrio ordalii* (strain: NCMB 2168). **Plate E:** *Vibrio anguillarum* 01 antiserum. Lane F: *Vibrio anguillarum* 01 (strain: Ft 256). **Plate F:** (absorbed with *Vibrio anguillarum* 02b) anti *Vibrio anguillarum* 02a antiserum. Lane G: *Vibrio anguillarum* 02a (strain: Ft257) Lane H: *Vibrio anguillarum* 02b (strain: Ft 618). **Plate G:** (absorbed with *Vibrio anguillarum* 02a) anti *Vibrio anguillarum* 02b antiserum. Lane I: *Vibrio anguillarum* 02a (strain: Ft257). Lane J: *Vibrio anguillarum* 02b (strain: Ft618). **Plate H:** anti *Vibrio salmonicida* antiserum. Lane K: *Vibrio salmonicida* (strain: NCMB 2262).

presentaron peces con signología muy similar entre los casos correspondían a una única especie fenotípica y genotípicamente idénticas, lo cual estaría muy vinculado con un único origen de las enfermedades infecciosas poblacionales y rápida expansión geográfica quizás debido a corrientes marinas, cercanía de centros, transporte peces y peces silvestres como vectores. La enfermedad en sí demostró ser devastadora si no es controlada a tiempo, como lo demostraron los ensayos de campo, cuyo desafío terminó con la vida del 100% de los peces al cabo de 45 días. Además presentó signología recurrente y típica, como lesiones externas caracterizadas por ser de tipo hemorrágicas, e internas de tipo necrotizante y granulomatosas.

Con respecto a la bacteria en sí, fenotípicamente demostraron tener las características típicas de *Vibrio* sp (Larsen y Petersen, 1999; West y col 1986). Al comparar las características fenotípicas de los aislados de campo y otros *Vibrio* sp patógenos de peces, como *V. salmonicida* y *Moritella (V) viscosa*, estos últimos requieren de temperaturas más bajas para su desarrollo y NaCl adicional para su crecimiento óptimo en medios de cultivo (Benediktsdottir y col 2000, Egidius y col 1986), a diferencia de los aislados de campo que no requirieron NaCl adicional y temperatura óptima de crecimiento mucho mayor.

Los análisis por IFAT de los 14 aislados de campo desarrollaron fuerte reacción positiva con los anticuer-

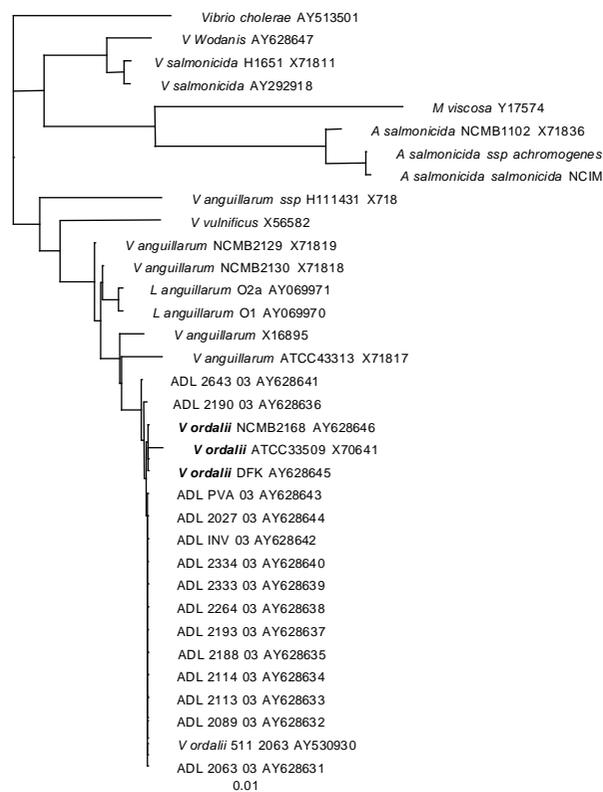


Figura 4. Arbol Neighbour-Joining derivado de las secuencias parciales del gen que codifica el rRNA 16s de los 14 aislados de campo y 19 cepas de referencias (números accesados en la misma figura). El árbol fue construido con ClustalX v1.83 (bootstrap = 1000) con el algoritmo Neighbour-Joining aplicando la corrección de Kimura. *Vibrio cholerae* fue elegido ruteador. La barra de escala muestra la tasa de sustitución de nucleótidos por sitio.

Neighbour-Joining tree derived from partial 16s rRNA gene sequences of the 14 pathogenic Chilean strains and 19 fish bacteria reference strains (sequence accession numbers are given after the strain name). The tree was constructed with ClustalX v1.83 with the Neighbour-Joining algorithm applying Kimura distance corrections. *Vibrio cholerae* was chosen as the outgroup. The scale bar shows nucleotide substitution rate per site. Bootstrap probabilities as determined for 1000 resamplings by ClustalX are given below the internal branches.

pos anti-*V. ordalii*, pero una muy débil reacción con anticuerpos policlonales anti-*V. salmonicida*, esto último quizás a una insuficiente adsorción o diferencias antigénicas con *V. ordalii* utilizados para la adsorción. El ensayo de aglutinación en látex como efectiva herramienta discriminadora (Larsen y col 1984) demostró que los aislados de campo compartían epítopes con *V. anguillarum* al reaccionar positivamente a la prueba, a diferencia de los test para *V. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* que resultaron negativos. La aglutinación de los aislados de campo con el kit para *V. anguillarum*, obedece al hecho que *V. ordalii* y *V. anguillarum* serotipo O2a tienen en común el antígeno polisacárido O y que difieren sólo en el grado de polimerización (Sadovskaya y col 1998). Esto ha sido repor-

tado, debido a la similitud de los lipolisacáridos de las 2 especies, donde se observan reacciones cruzadas comúnmente en anticuerpos no adsorbidos. Por otra parte, es bien conocido que *V. ordalii* y *V. anguillarum* O2a contienen determinantes antigénicos específicos que permite diferenciarlos (Chart y Trust, 1984, Mutharia y col 1993). La pérdida de reactividad en el IFAT de los aislados de campo y los anticuerpos anti-*V. anguillarum* O1 y O2 principalmente es debida a que son adsorbidos previamente contra *V. ordalii*. Bioquímicamente, los ensayos con el sistema API20E han sido previamente usados para el análisis de diferentes patógenos de peces como: *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *Moritella viscosa*, *V. salmonicida*, *V. wadonis* (Gregar y Goodrich 1999, Grisez y col 1991) y *Yersinia ruckeri* (Rodríguez y col 1999, Romalde y col 1991). Es más, la revisión literaria de las características bioquímicas de varios patógenos de peces ha sido recientemente publicada (Buller 2004). Todos los aislados de campo mostraron similar perfil bioquímico entre sí en los diferentes ensayos utilizados, a excepción del ensayo de gelatina en API 20E (#00040245 ó 00060245), pero no una perfecta correlación con los perfiles de las cepas controles usados, incluso las cepas controles de *V. ordalii* mostraron un perfil diferente (#00041125); sin embargo, este último perfil es coherente con lo descrito por Egidius (1986), esta divergencia hace imperante la utilización de pruebas adicionales a las bioquímicas para su identificación. En general, los aislados de campo obtuvieron un número bajo de pruebas positivas, observada también en los controles de *Moritella viscosa*, *V. salmonicida*, *V. wadonis* y *V. ordalii*, pero claramente diferenciables de *V. anguillarum* que se caracterizaron por su alto número de pruebas positivas debido a su complejidad bioquímica (Actis y col 1999, Grisez y col 1991, Larsen y Pedersen 1999, Myhr y col 1991, West y col 1986, Wiik y col 1995). También, acorde a la literatura ha sido descrito que el grupo de *Vibrio sp* puede ser subagrupado en base a sus reacciones L-arginina, L-lisina y L-ornitina (Grupo ALO), según lo descrito por Buller (2004), Larsen y Petersen (1999). Los aislados chilenos mostraron que estas tres reacciones fueron negativas, lo cual los integra al grupo de *V. salmonicida*, *V. ordalii* y *V. wadonis* (Benediktsdottir y col 1998, Larsen y Petersen 1999, Lunder y col 2000).

El análisis de SDS-PAGE y Western blot de los antígenos celulares totales de los aislados de campo no reveló identidad con respecto a los controles de referencia usados, incluso fue diferente con *V. ordalii* de referencia. Sin embargo, entre los aislados de campo mostraron idénticos perfiles de bandas con todos los antisueros usados. Además, el número de bandas positivas con los antisueros utilizados fue mayor en los aislados de campo y *Vibrio sp* de referencia que en los géneros no-*Vibrio*.

El análisis filogenético reveló que los 14 aislados de campo presentaban la misma secuencia de nucleóti-

dos, lo cual indica que corresponden al mismo patógeno. Al suministrar las secuencias de los aislados chilenos en BLASTN, éstas dieron como mejor score a *V. ordalii* (ATCC 33509^T), seguido de cerca por *V. anguillarum* NCMB6, sin embargo, esta última cepa fue agrupada dentro del grupo *V. ordalii* de acuerdo con el análisis filogenético publicado por Jensen y col (2002). El alineamiento múltiple de las secuencias de la región comprendida entre el nucleótido 62 al 1339 del gen RNAr 16s mostró diferencias significativas entre los aislados de campo y las cepas de referencia *Moritella viscosa*, *Aeromonas salmonicida*, *V. wodanis* y *V. salmonicida*, por lo cual los aislados de campo no corresponden a estas especies. Por otro lado, existe una clara diferencia en el alineamiento, por la inserción de 5 bases (GCACT) en las posiciones 1466-1470 en las secuencias de los aislados de campo y en el grupo *V. ordalii*, pero estas 5 bases están ausentes en el grupo *V. anguillarum*. La ribotipificación por RNAr 16s ha sido reportada útil previamente para diferenciar *V. anguillarum* de *V. ordalii* (Tiainen y col 1995), y mejor que la fenotipificación (Montes y col 2003), sin embargo la ribotipificación ha sido insuficiente para diferenciar otras especies de *Vibrio* cercanamente relacionadas (Thompson y col 2002 y Montes y col 2003) y variantes dentro de una misma especie (Thompson y col 2004), para lo cual es necesario utilizar otras técnicas como AFLP, rep-PCR, hibridación DNA-DNA (Thompson y col 2001) y marcadores filogenéticos (Thompson y col 2004).

Finalmente, la tasa de similitud y el árbol filogenético derivados del alineamiento múltiple de las secuencias indicaron claramente que los aislados de campo pertenecen al grupo de *V. ordalii* y no a otras bacterias incluidas en este estudio. Los análisis fenotípicos y filogenéticos muestran una alta homogeneidad entre los aislados de campo, por lo menos los incluidos dentro de este estudio y que están ampliamente distribuidos en Chile y que constituye un problema serio para la industria del salmón en el país. Por esta razón, las cepas de campo podrían ser consideradas como un biotipo o fenotipo atípico de *V. ordalii*, aunque para ello es necesario más estudios comparativos entre los genomas completos de esta bacteria.

RESUMEN

Durante invierno y primavera de 2003, salmones del Atlántico cultivados en las costas marinas del sur de Chile fueron afectados por brotes de una enfermedad. El análisis patológico reveló la presencia de lesiones en piel, úlceras hemorrágicas, mientras que los signos internos incluyeron pericarditis, peritonitis y focos necróticos múltiples en el hígado. En todos los casos, los cultivos bacterianos puros fueron aislados de las lesiones externas y órganos internos. La bacteriología convencional mostró como sospechoso a *Vibrio sp* como causante de la enfermedad. La identificación final de la bacteria fue llevada a cabo por análisis filogenético por la comparación de la secuencia casi total del gen que codifica el RNAr 16s. Este análisis reveló que las bacterias

sospechosas pertenecen al grupo de los *V. ordalii*. Fenotípicamente, estas bacterias mostraron diferencias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, enzimáticas y antigénicas a los *V. ordalii* de referencia. Por esta razón, las cepas de campo podrían ser consideradas como un biotipo o fenotipo atípico de *V. ordalii*, aunque para ello es necesario más estudios comparativos entre los genomas completos de estas bacterias.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos al Dr. Stephan Villoing y al Dr. Jegathes Thevarajan de Intervet-Norbio (Bergen, Noruega) por su gran aporte con experiencia y conocimientos en filogenética bacteriana.

Agradecimientos al Dr. David Groman de UPEI (Canadá) por su experiencia y diagnóstico en los análisis histopatológicos.

Agradecimientos al Grupo Quellón por permitir las condiciones apropiadas para investigación científica.

Agradecimientos al Dr. Rubén Silva por sus aportes en epidemiología y terapéutica.

Agradecimientos al Sr. Gerardo Gómez y al Sr. Moisés Rivera por su aporte y experiencia en anatomía patológica.

REFERENCIAS

- Actis LA, ME Tolmasky, JH Crosa. 1999. *Vibriosis*, en: Woo PTK, Bruno D W (eds). *Fish diseases and disorders*. U.K., Pp 523-557.
- Austin B, DA Austin. 1999. *Fish pathogens*, 3ª edición, Pp 477.
- Benediktsdottir E, S Helgason, H Sigurjonsdottir. 1998. *Vibrio sp* isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperatures. *J Fish Dis* 21, 19-28.
- Benediktsdottir E, L Verdonck, C Sproer, S Helgason, J Swings. 2000. Characterization of *Vibrio viscosus* and *Vibrio wodanis* isolated at different geographical locations: a proposal for reclassification of *Vibrio viscosus* as *Moritella viscosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 479-488.
- Buller NB. 2004. *Bacteria from fish and other aquatic animals; a practical identification manual*. CABI Publishing, U.K.
- Chart H, TJ Trust. 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Can J Microbiol* 30, 703-710.
- Egidius E, R Wiik, K Andersen, KA Hoff, B Hjeltmes. 1986. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 36, 518-520.
- Greger E, T Goodrich. 1999. Vaccine development for winter ulcer disease, *Vibrio viscosus*, in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 22, 193-199.
- Grisez L, R Ceuster, F Ollevier. 1991. The use of API20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J Fish Dis* 14, 359-365.
- Grisez L, F Ollevier. 1995. Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol* 12, 4367-4373.
- Jensen S, O Bergh, O Enger, B Hjeltmes. 2002. Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Can J Microbiol* 5, 379-386.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsen JL, S Mellergaard. 1984. Agglutination typing of *Vibrio anguillarum* isolates from diseased fish and from the environment. *Appl Environ Microbiol* 47, 1261-1265.
- Larsen JL, K Pedersen. 1999. *Fiskehelse of Fiskesykdommer*. Tesis doctoral, Universitetsforlaget, Oslo.

- Lunder T, H Sorum, G Holstad, AG Steigerwalt, P Mowinckel, DJ Brenner. 2000. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 427-450.
- Montes M, R Farto, MJ Pérez, TP Nieto, JL Larsen, H Christensen. 2003. Characterization of *Vibrio* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) culture by phenotypic analysis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence comparison. *J Appl Microbiol* 95, 693-703.
- Mutharia L W, BT Raymond, TR Dekievit, RM Stevenson. 1993. Antibody specificities of polyclonal rabbit and rainbow trout antisera against *Vibrio ordalii* and serotype O:2 strains of *Vibrio anguillarum*. *Can J Microbiol* 39, 492-499.
- Myhr E, JL Larsen, A Lillehaug, R Gudding, M Heum, T Hastein. 1991. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Appl Environ Microbiol* 57, 2750-2757.
- Rodríguez LA, A Castillo, CS Gallardo, TP Nieto. 1999. Outbreaks of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout in north west of Spain. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 19, 130-132.
- Romalde JL, AE Toranzo. 1991. Evaluation of the API20E system for the routine diagnosis of the enteric red mouth disease. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 11, 411-419.
- Sadovskaya I, JR Brisson, NH Khieu, LM Mutharia, E Altman. 1998. Structural characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and capsular polysaccharide of *Vibrio ordalii* serotype O:2. *Eur J Biochem* 253, 319-327.
- Schiewe MH, JH Crosa, E Ordal. 1977. Deoxyribonucleic acid relationships among marine *Vibrios* pathogenic to fish. *Can J Microbiol* 23, 954-958.
- Schiewe^a MH, JH Crosa. 1981. Molecular characterization of *Vibrio anguillarum* biotype 2. *Can J Microbiol* 27, 1011-1018.
- Schiewe^b MH, T Trust, HH Crosa. 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of *Vibriosis* in fish. *Curr Microbiol* 6, 343-348.
- Thompson JD, TJ Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin, DG Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc Ac Res* 24, 4876-4882.
- Thompson FL, B Hoste, CC Thompson, J Goris, B Gomez-Gil, L Huys, P de Vos, J Swings. 2002. *Enterovibrio norvegicus* gen. nov., sp. nov., isolated from the gut of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae: a new member of the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 2015-2022.
- Thompson FL, B Hoste, K Vendemeulebroecke, J Swings. 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol* 24, 520-538.
- Thompson CC, FL Thompson, K Vandemeulebroecke, B Hoste, P Dawyndt, J Swings. 2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 919-924.
- Tiainen T, K Pedersen, JL Larsen. 1995. Ribotyping and plasmid profiling of *Vibrio anguillarum* serovar O2 and *V. ordalii*. *J Appl Bacteriol* 79, 384-392.
- West PA, PR Brayton, TN Bryant, RR Colwell. 1986. Numerical taxonomy of *Vibrios* isolated from aquatic environments. *Int J Syst Bacteriol* 36, 531-543.
- Wiik R, E Stackebrandt, O Valle, FL Daae, OM Rodseth, K Andersen. 1995. Classification of fish-pathogenic *Vibrios* based on comparative 16S rRNA analysis. *Int J Syst Bacteriol* 45, 421-428.