

## **Flexibatteriosi da *Tenacibaculum maritimum* sierotipo O3 in pesce capone (*Chelidonichthys lucernus* L.) d'allevamento: prima segnalazione in Italia**

*First report of Tenacibaculum maritimum serotype O3  
infection in cultured tub gurnard  
(Chelidonichthys lucernus L.) in Italy*

**Gian Enrico Magi<sup>1\*</sup>, Ruben Avendaño-Herrera<sup>2†</sup>,  
Alicia Estevez Toranzo<sup>2</sup>, Jesus Lopez Romalde<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Università di Camerino, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Veterinarie;  
Via Circonvallazione 93/95 – 62024 Matelica (MC);

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago -  
15782, Santiago de Compostela, Spain

<sup>†</sup> Present address: Veterquímica S.A., Camino a Lonquén - 10387 Maipú, Santiago, Chile.

---

**RIASSUNTO** – Viene qui descritto il primo isolamento di *Tenacibaculum maritimum* in pesce capone (*Chelidonichthys lucernus* L.) d'allevamento in Italia. Un gruppo di 20 esemplari a distanza di 3 giorni dal trasporto da un allevamento agli impianti sperimentali dell'Università di Camerino hanno manifestato gravi lesioni ulcerative a carico della pelle, della bocca e delle pinne. Dopo 9 giorni dall'inizio della sintomatologia il tasso di mortalità raggiunto era del 90%. La terapia antibiotica non ha permesso il controllo della malattia. Analisi batteriologiche classiche e molecolari hanno permesso di identificare l'agente causale come *Tenacibaculum maritimum*. Attraverso caratterizzazione sierologia dell'antigene somatico O il ceppo è stato incluso nel sierotipo O3. All'esame istologico le lesioni cutanee erano caratterizzate da necrosi dell'epitelio mentre a livello del derma si osservava intensa congestione vasale e presenza di infiltrato costituito da granulociti eterofili e macrofagi. Attraverso l'esame immunohistochimico della cute sono state evidenziate numerose cellule macrofagiche positive. L'elevata mortalità verificatasi ci porta a concludere che il *T. maritimum* può essere considerato un agente potenzialmente pericoloso per l'allevamento del pesce capone.

**SUMMARY** – *The present study describes the first isolation of Tenacibaculum maritimum from tub gurnard (Chelidonichthys lucernus L.), cultured in Italy. After 3 days shipment from one fish farm to our laboratory facilities, a group of 20 tub gurnard showed eroded mouth, rotten fins and severe skin ulcerative lesions. Mortality reached 90% of the population in 9 days. Traditional bacteriological and PCR analysis allowed the identification of the causative agent as T. maritimum. Serological characterization of the isolate demonstrated that it belongs to serotype O3. Histopathological examination showed severe skin necrosis, dermis congestion associated with heterophilic and macrophagic infiltration. Immunohistochemical analysis, using specific polyclonal antiserum against T. maritimum serotype O3, allowed the visualization of numerous positively stained macrophagic cells. The high mortality observed during the outbreak leads to consider the T. maritimum as a potential risk for the culture of tub gurnard.*

**Key words** : Tub gurnard, *Chelidonichthys lucernus*, Pathology, *Tenacibaculum maritimum*.

---

\* Corresponding author: c/o Dipartimento di Scienze Veterinarie, Sezione di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti. Via Circonvallazione 93/95 – 62024 Matelica (MC). Tel.: 0737/403424; Fax: 0737-403402; E-mail: gianenrico.magi@unicam.it

## INTRODUZIONE

Il significativo sviluppo realizzato negli ultimi 20 anni dalla piscicoltura mediterranea è stato principalmente ottenuto grazie all'allevamento dell'orata e della spigola. La rapida crescita dell'offerta di prodotto ha comportato una riduzione dei margini di profitto per gli operatori in acquacoltura, con conseguente aumento della domanda di innovazioni tecnologiche e di ricerca, atte a ridurre i costi di produzione. Questa situazione ha indotto gli esperti del settore a rivolgere la propria attenzione verso nuove specie, al fine di diversificare le produzioni e di ampliare il mercato. Tra queste nuove specie il pesce capone o gallinella, *Chelidonichthys lucernus* (precedentemente conosciuta come *Trigla lucerna*), sembra essere un nuovo valido candidato per l'acquacoltura mediterranea, sia per quanto riguarda il suo interesse commerciale sia per l'adattabilità alle condizioni di allevamento. Studi condotti negli ultimi anni riguardanti la messa a punto di metodiche di riproduzione controllata e di primo svezzamento larvale, hanno dimostrato una sostanziale fattibilità dell'allevamento anche se il novellame ottenuto non è ancora concorrenziale in termini di prezzo con quello pescato (Melotti *et al.*, 1998; 2000). Ad oggi le informazioni riguardanti le patologie che possono manifestarsi in questa specie in allevamento sono molto scarse.

Tra le malattie infettive di molte specie ittiche marine allevate la tenacibaculosi o flexibatteriosi marina, sostenuta da *Tenacibaculum maritimum*, è un'importante malattia batterica segnalata in varie parti del mondo, responsabile di perdite significative nell'allevamento del rombo (*Scophthalmus maximus*), del salmone atlantico (*Salmo salar*), del branzino (*Dicentrarchus labrax*), dell'orata (*Sparus aurata*) (Devesa *et al.*, 1989; Bernadet *et al.*, 1990; Pazos *et al.*, 1993; Ostland *et al.*, 1999) e recentemente anche della sogliola (*Solea solea* e *S. senegalensis*) (Cepeda & Santos, 2002; Avendaño-Herrera *et al.*, 2004a). I segni della malattia sono rappresentati da gravi lesioni esterne erosive/ulcerative a carico della cute, della bocca e delle pinne. La visualizzazione, dopo opportuna colorazione, di batteri filamentosi da raschiati cutanei effettuati dalle lesioni sopra menzionate, è importante ai fini della diagnosi. L'isolamento può risultare difficoltoso a causa della lenta crescita e della presenza di batteri contaminanti le lesioni esterne che possono impedire la crescita di *T. maritimum*, soprattutto quando la concentrazione di quest'ultimo è bassa. A tal fine un utile strumento diagnostico è rappresentato dalle metodiche di biologia molecolare che permettono di identificare il patogeno in questione in maniera rapida e specifica (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004b).

Lo scopo del presente lavoro è di segnalare il primo episodio in Italia di tenacibaculosi nel pesce capone allevato, sottolineando gli aspetti anatomo-clinici della malattia e l'identificazione del ceppo isolato attraverso metodiche di microbiologia classica e molecolari.

## MATERIALI E METODI

Nel novembre del 2004 si è verificato un grave episodio di mortalità in un gruppo di 20 esemplari di *Chelidonichthys lucernus* di allevamento del peso medio di 150 g., ospitati negli impianti sperimentali dell'Università di Camerino. Gli animali, provenienti da una allevamento italiano e precedentemente mantenuti in vasche in cemento, erano stabulati in un modulo del volume di circa 16 m<sup>3</sup> sprovvisto di sabbia, funzionante attraverso un sistema di filtrazione, disinfezione e ricircolo dell'acqua, ad una temperatura di circa 15°C. Dopo tre giorni dal loro arrivo diversi soggetti hanno manifestato gravi lesioni necrotico-ulcerative della cute e delle pinne che, in alcuni casi, interessavano la muscolatura sottostante ed al quarto giorno molti di essi sono venuti a morte. Quattro esemplari moribondi sono stati

sottoposti ad esame parassitologico a fresco, necroscopico, batteriologico e istologico. Gli esami batteriologici sono stati effettuati a partire da lesioni cutanee, rene, fegato, cervello e branchie su Tryptone Soya Agar (Oxoid) addizionato con NaCl all'1%, su Thiosulphate Citrate Bile Salts (T.C.B.S., Oxoid) e su *Flexibacter maritimus* Medium (FMM) (Pazos *et al.*, 1996). Le piastre sono state incubate a 22°C per 48 h e le colonie isolate sono state identificate attraverso l'impiego di test in macrometodo standard, al fine di evidenziare le caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche dei batteri.

Lo studio sierologico del ceppo isolato è stato effettuato impiegando sia test di agglutinazione su vetrino, così come riportato da Toranzo *et al.* (1987), sia attraverso la metodica dot blot, così come descritta da Cipriano *et al.* (1985) e rivelatasi più indicativa in un precedente studio per *T. maritimum* (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004a). Per queste prove sono stati utilizzati antisieri ottenuti contro ceppi rappresentativi dei tre sierotipi finora conosciuti. Per il sierotipo O1 è stato utilizzato il ceppo PC 503.1, isolato dalla sogliola in Spagna, per il sierotipo O2 è stato utilizzato il ceppo PC 424.1, isolato dal rombo in Spagna e per il sierotipo O3 è stato utilizzato il ceppo ACC 13.1, isolato dalla sogliola in Portogallo. I sieri sono stati preparati secondo la metodica di Sørensen & Larsen (1986). Gli antisieri sono stati inoltre cross-adsorbiti con i ceppi eterologhi così come riportato da Stevenson & Daly (1982). In breve, per l'adsorbimento i tre sieri rappresentativi dei tre diversi sierotipi sono stati mescolati con gli antigeni dei ceppi eterologhi ed incubati overnight a 4°C. Questa operazione è stata ripetuta due volte al fine di ottenere un completo adsorbimento degli antigeni comuni. In tutti i test sierologici è stata utilizzata sia la cellula batterica intera che l'antigene O somatico termostabile, ottenuto attraverso il trattamento di una sospensione batterica ( $10^9$  cellule/ml) in PBS a 100°C per 60 minuti.

Il ceppo isolato è stato anche identificato mediante PCR che ha previsto l'estrazione del DNA attraverso l'impiego di Insta-Gene Matrix (Bio-Rad), così come indicato dalla ditta produttrice.

La reazione di amplificazione ha previsto l'impiego di un set di primers specie-specifici MAR1 (5'-AATGGCATCGTTTTAAA-3') e MAR2 (5'-CGCTCTCTGTTGCCAGA-3') (Toyama *et al.*, 1996), che amplificano un segmento di 1088 basi. Le condizioni per l'amplificazione hanno previsto l'utilizzo del kit commerciale Ready-To-Go PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech). L'amplificazione è stata condotta in un termociclatore T-Gradient (Biometra) applicando il seguente ciclo: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, seguita da 40 cicli a 94°C per 2 minuti (denaturazione), 45°C per 90 secondi (annealing) e 72°C per 2 minuti (allungamento), seguiti da un'estensione finale a 72°C per 5 minuti. Nella reazione di amplificazione sono stati inclusi un controllo positivo (ceppo NCIMB 2154<sup>T</sup>) e un controllo negativo. Il prodotto di PCR è stato analizzato attraverso elettroforesi in un gel di agarosio 1% con tampone TAE 1% (0,04 m Tris-acetato, 1 mm EDTA); al gel sono stati aggiunti 0,5 µg/ml di bromuro di etidio e un marcatore di peso molecolare di 50-2000 paia di basi (PCR Marker, Sigma). Dopo separazione elettroforetica il prodotto è stato visualizzato con un transilluminatore a raggi UV (BioRad).

Per l'esame istologico, porzioni di branchie, fegato, rene, milza, cuore, cute e cervello sono state fissate in formalina neutra tamponata al 10% ed incluse in paraffina; sezioni dello spessore di 4 µm sono state colorate con Ematossilina Eosina (EE) e Giemsa (G). Su sezioni di cute è stato condotto esame immunoistochimico attraverso complesso avidina-biotina (ABC)-perossidasi, utilizzando come cromogeno la diaminobenzidina. Le sezioni preventivamente trattate al calore per 10 minuti in soluzione di tampone citrato (pH 6,0), sono state incubate overnight con anticorpo policlonale di coniglio, ottenuto secondo quanto descritto da Sørensen & Larsen (1986) contro il ceppo ACC 13.1 sierotipo O3, isolato da *Solea senegalensis*. Come controllo negativo alle sezioni è stato aggiunto siero normale di capra al posto dell'anticorpo primario.

## RISULTATI

Esternamente i quattro pesci esaminati presentavano estesi e profondi fenomeni necrotico-erosivi distribuiti plurifocalmente sulla cute, sulla bocca e a livello delle pinne (Fig. 1). All'apertura della cavità corporea non si apprezzavano alterazioni degne di nota. L'esame microscopico a fresco di raschiati effettuati dalle aree cutanee colpite, ha permesso di evidenziare la presenza di numerosi batteri filamentosi riconducibili al gruppo *Flexibacter-like* (Fig. 2). Dall'esame batteriologico, dopo 72 ore di incubazione su FMM da lesioni cutanee, si è ottenuta la crescita di colonie giallastre, dai margini irregolari. Le colonie sono state identificate in base alle caratteristiche fenotipiche come *Tenacibaculum maritimum*. L'esame batteriologico condotto dagli organi interni ha dato esito negativo. Dai test fenotipici e in macrometodo effettuati, il ceppo isolato è risultato Gram negativo, mobile per movimenti sciamanti, negativo alla prova della produzione di flexirubina e alla produzione di acido solfidrico, positivo alla prova di assorbimento di rosso Congo e positivo per la riduzione di nitrati. L'identificazione è stata confermata anche mediante PCR che ha permesso di evidenziare la comparsa della banda specifica di 1088 paia di basi (Fig. 6). L'esame sierologico, condotto attraverso agglutinazione su vetrino, ha evidenziato una agglutinazione con l'antisiero O3, sia quando è stata impiegata la cellula intera, sia quando è stato utilizzato l'antigene O termostabile. Anche con la prova dot blot è stata osservata una reazione quando è stato utilizzato l'antisero ottenuto contro il ceppo O3 (Fig. 5). L'esame parassitologico a fresco, effettuato sia attraverso raschiati cutanei e branchiali che mediante preparati allestiti per impronta di organi interni, non ha permesso di evidenziare la presenza di parassiti.

Istologicamente le lesioni cutanee e delle pinne erano caratterizzate da un marcato fenomeno necrotico dell'epidermide che appariva disepitelizzata, mentre a livello del derma si osservava intensa congestione vasale e presenza di infiltrato infiammatorio costituito da granulociti eterofili e macrofagi (Fig. 3). Nelle zone più superficiali del derma si potevano inoltre osservare clusters batterici basofili e localmente distacco di alcune aree dermiche dai piani muscolari sottostanti. L'esame immunoistochimico ha messo in evidenza numerosi macrofagi, tra la componente eterofila, il cui citoplasma è risultato fortemente immunopositivo per l'antigene indagato (Fig. 4). Non sono state riscontrate lesioni istologiche negli altri organi esaminati.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il pesce capone o gallinella, *Chelidonichthys lucernus*, è un pesce comune nel Mar Mediterraneo e risulta particolarmente interessante per l'acquacoltura nazionale (Melotti *et al.*, 1998), ma ancora poco studiato per ciò che riguarda le malattie che possono colpirlo in condizioni di allevamento.

In questo lavoro viene descritto il primo isolamento di *Tenacibaculum maritimum* nel pesce capone allevato in Italia. Le indagini microbiologiche, sia standard che biomolecolari, quelle sierologiche, quelle anatomopatologiche ed immunoistochimiche hanno permesso di emettere la diagnosi di tenacibaculosi da *T. maritimum*, sierotipo O3 nel gruppo di pesci capone da noi studiato. La terapia effettuata mediante bagni medicati con ossitettraciclina non ha permesso il controllo della malattia che ha determinato dopo 9 giorni dall'inizio della sintomatologia la morte del 90% dei pesci.

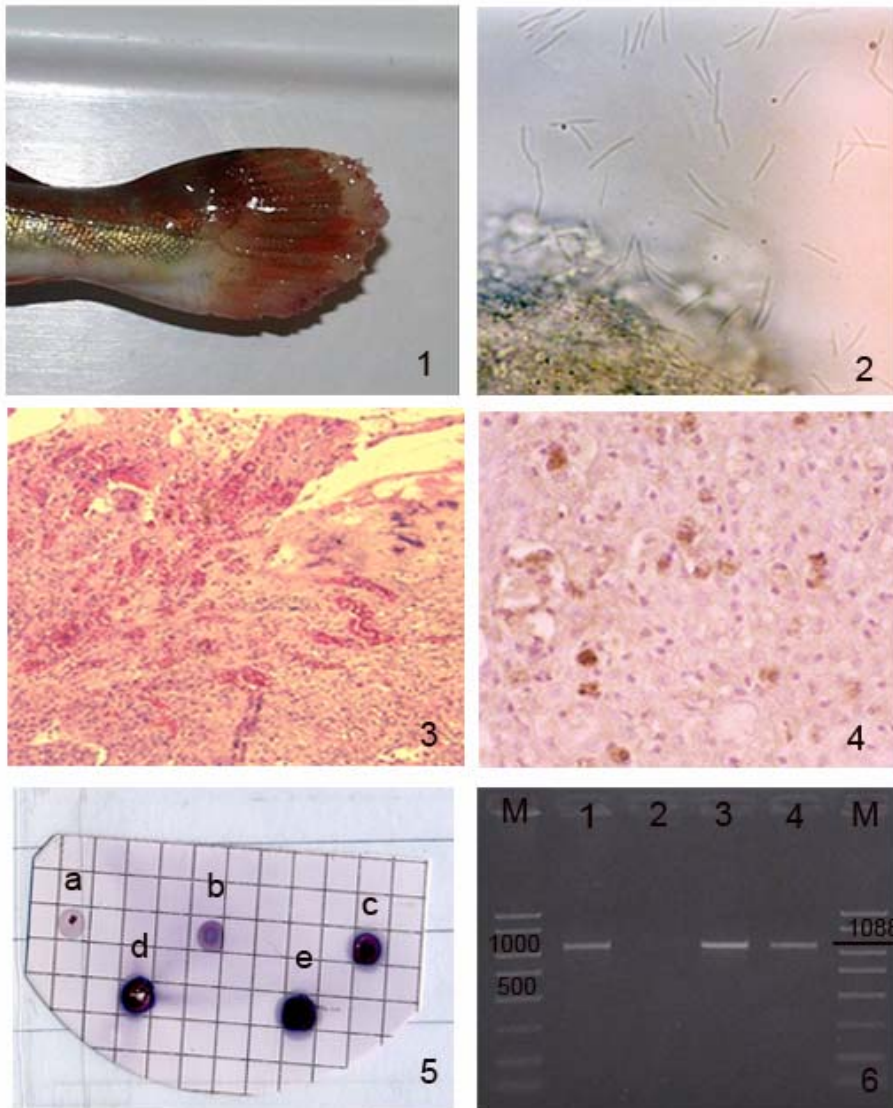


Tavola 1 – Fig. 1: pesce capone (*Chelidonichthys lucernus*) con lesioni necrotico-erosive alla pinna caudale. Fig. 2: batteri filamentososi da raschiato cutaneo a fresco (100x). Fig. 3: sezione di cute con necrosi dell’epitelio, congestione ed infiltrazione infiammatoria del derma (E.E., 10x). Fig. 4: immunolocalizzazione di macrofagi positivi a *Tenacibaculum maritimum* in sezione di cute (E.E., 40x). Fig. 5: dot blot del ceppo di *Tenacibaculum maritimum* isolato attraverso l’utilizzo di antisiero ottenuto dal ceppo ACC 13.1 isolato dalla sogliola. Dots: a, sierotipo O1 (ceppo PC 503.1); b, sierotipo O2 (ceppo PC 424.1); c, sierotipo O3 (ceppo ACC 13.1); d-e, nuovi ceppi isolati nel pesce capone appartenenti al sierotipo O3. Fig. 6: identificazione di *Tenacibaculum maritimum* con PCR. Linee: M, 50-2000 pb marcatore molecolare (Sigma); 1, controllo positivo (NCIMB 2154<sup>T</sup>); 2, controllo negativo; 3-4 ceppi isolati da pesce capone. Il numero a destra indica il segmento specifico di amplificazione di 1088 paia di basi.

Plate I - Fig. 1: tub gurnard (*Chelidonichthys lucernus*) with fin erosion. Fig 2: wet mounts of skin lesion showing long, thin rods (100x). Fig. 3: histological skin section showing necrosis of epidermis, congestion and inflammation of dermis (E.E. 10x). Fig. 4: macrophages positive for *Tenacibaculum maritimum* antibody. IHC. (E.E., 40x). Fig. 5: dot blot assay of the isolates of *Tenacibaculum maritimum*, using the antiserum raised against the sole isolate ACC 13.1. Dots: a, serotype O1 (strain PC 503.1); b, serotype O2 (strain PC 424.1); c, serotype O3 (strain ACC 13.1); d-e, new tub gurnard isolates belonging to serotype O3. Fig. 6: specific PCR products. Lanes: M, 50-2000 pb molecular ladder (Sigma); 1, positive control (NCIMB 2154<sup>T</sup>); 2, negative control; 3-4 tub gurnard isolates. Number on the right indicates the size of the specific amplified products in bp (1088-bp).

Indagini recenti riguardanti le caratteristiche antigeniche di ceppi di *T. maritimum* isolati da diverse specie ittiche allevate (sogliola, orata, rombo) hanno dimostrato l'esistenza di tre sierotipi sulla base dell'antigene O (O1, O2, O3) (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004a) ed in particolare il sierotipo O3, finora meno comune, è stato correlato a ceppi responsabili di episodi di mortalità in sogliole allevate in Portogallo e nel sud della Spagna (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005). La caratterizzazione sierologica del ceppo in questione da noi effettuata è risultata importante, sia al fine di considerare questo sierotipo in un eventuale preparazione vaccinale che per gli aspetti epidemiologici ad esso connessi. È importante inoltre sottolineare il fatto che il grave episodio di mortalità si è verificato qualche giorno dopo il trasferimento degli animali da un allevamento alle strutture sperimentali dell'Università di Camerino.

Il pesce capone è una specie bentonica che vive soprattutto su fondali ghiaiosi, sabbiosi e melmosi, dove si sposta appoggiandosi sui raggi liberi delle pinne pettorali che muove a guisa di piccole zampe. L'abbassamento delle difese immunitarie conseguenti al trasporto, eventuali microlesioni cutanee verificatesi durante la cattura e lo spostamento degli animali in vasche con fondo privo di sabbia hanno sicuramente condizionato il grave evento infettivo.

Da uno studio condotto di recente sulla patogenesi dell'infezione sperimentale da *Flavobacterium psychrophilum* (germe affine a *T. maritimum*) nella passera giapponese è stato dimostrato che la prima porta di entrata per il germe è rappresentata da microlesioni cutanee a genesi traumatica (Bernadet *et al.*, 2002; Miwa & Nakayasu, 2005). Magariños *et al.* (1995) hanno dimostrato che nel rombo il sito primario di infezione del *T. maritimum* è la superficie corporea. Per quanto riguarda il nostro caso, anche se riteniamo utili ulteriori studi sulla patogenicità del ceppo in questione nei confronti di questa specie ittica, l'elevata mortalità verificatasi ci porta a concludere che *Tenacibaculum maritimum* può essere considerato un agente potenzialmente pericoloso per l'allevamento del pesce capone.

## BIBLIOGRAFIA

- Avendaño-Herrera R., Magariños B., López-Romalde S., Romalde J.L. & Toranzo A.E. (2004a). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from marine fishes. *Dis. Aquat. Org.*, 58: 1-8.
- Avendaño-Herrera R., Magariños B., Moriñigo M.A., Romalde J.L. & Toranzo A.E. (2005). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 25: 70-74.
- Avendaño-Herrera R., Magariños B., Toranzo A.E., Beaz R. & Romalde J.L. & (2004b). Comparative evaluation of species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Dis. Aquat. Org.*, 62: 75-83.
- Bernadet J.F., Campbell A.C. & Buswell J.A. (1990). *Flexibacter maritimus* is the agent of 'black path necrosis' in Dover sole in Scotland. *Dis. Aquat. Org.*, 8: 233-237.
- Bernadet J.F., Nakagawa Y. & Holmes B. (2002). Proposed minimal standards for new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1049-1070.
- Cepeda C. & Santos Y. (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22: 388-391.

- Cipriano R.C., Pyle J.B., Starliper C.E. & Pyle S.W. (1985). Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by dot blot assay. *J. Wildlife Dis.*, 21: 211-218.
- Devesa S., Barja J.L. & Toranzo A.E. (1989). Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, 12: 323-333.
- Magariños B., Pazos F., Santos Y., Romalde J.L. & Toranzo A.E. (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, 21: 103-108.
- Melotti P., Roncarati A., Mordenti O. & Gennari L. (1998). Tecniche di riproduzione indotta ed allevamento larvale di *Trigla lucerna*. *Biol. Mar. Medit.*, 5: 1266-1272.
- Melotti P., Roncarati A., Mordenti O. & Gennari L. (2000). Larval rearing and weaning of *Trigla lucerna* L. *Third Workshop of the COST 827 action on Voluntary Food Intake in Fish 8-10 June 2000, Maratea, Italy*.
- Miwa S. & Nakayasu C. (2005). Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, 67: 93-104.
- Ostland V.E., La Trace C., Morrison D. & Ferguson H.W. (1999). *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *J. Aquat. Animal Health*, 11: 35-44.
- Pazos F., Santos Y., Macias A.R., Nuñez S. & Toranzo A.E. (1996). Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J. Fish Dis.*, 19: 193-197.
- Pazos F., Santos Y., Nuñez S. & Toranzo A.E. (1993). Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in the marine aquaculture of Spain. *AFS/FHS News letter*, 21: 1-2.
- Sørensen U.B.S. & Larsen J.L. (1986). Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 593-597.
- Stevenson R.M.W. & Daly J.G. (1982). Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian J. Fisheries Aquat. Science*, 39: 870-876.
- Toranzo A.E., Baya A., Robertson B.S., Barja J.L., Grimes D.J. & Hetrick F.M. (1987). Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 61: 81-97.
- Toyama T., Kita-Tsukamoto K. & Wakabayashi H. (1996). Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S Ribosomal DNA. *Fish Pathol.*, 31: 25-31.