



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The importance of detection limits in the diagnosis of asymptomatic furunculosis.
Author(s)	Ronald, Dublin. D.; Yoshimizu, Mamoru; Kasai, Hisae
Citation	Revista Electronica de Veterinaria, 15(6), 1-11
Issue Date	2014
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57048
Type	journal article
File Information	559 REDVET 15(6) 1-11.pdf



La importancia de los límites de detección en el diagnóstico de la forunculosis asintomática - The importance of detection limits in the diagnosis of asymptomatic furunculosis

Dublín, Devon Ronald, MVZ: Center for Sustainability Science, Kita 9 Nishi 8, Hokkaido University, Sapporo, Japan, 060-0809. devdub@yahoo.com **devdub**; **Yoshimizu, Mamoru**, Ph.D: Laboratory of Marine Microbiology and Biotechnology, Graduate School of Fisheries Sciences, 3-1-1 Minato, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido, Japan 041-8611 yosimizu@fish.hokudai.ac.jp ; **Kasai, Hisae**, Laboratory of Marine Microbiology and Biotechnology, Graduate School of Fisheries Sciences, 3-1-1 Minato, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido, Japan 041-8611 hisae@fish.hokudai.ac.jp

Resumen

El éxito de los métodos empleados para la detección de *Aeromonas salmonicida* depende de varios factores, incluyendo los límites de detección que muchas veces no son considerados en la elaboración de un protocolo de diagnóstico. En primer lugar, se analizaron los límites de detección de *A. salmonicida* cultivado en Agar Azul de Coomassie (AAC), la prueba de Inmunofluorescencia (IF), la prueba de Coaglutinación (CoAgT) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). A continuación, un experimento controlado de laboratorio húmedo se llevó a cabo utilizando 60 alevines de salmón masu (*Oncorhynchus masou*) inoculados con *A. salmonicida* y sobre la base de los resultados obtenidos, a continuación, se llevó a cabo una investigación epidemiológica en ríos seleccionados en Hokkaido, las islas más al norte de Japón. Los límites de detección fueron 10^2 para AAC, 10^4 para la IF, 10^5 para la PCR y 10^3 para la CoAgT de un cultivo de caldo original de *A. salmonicida*, de $1,3 \times 10^8$ UFC / mL, lo que demuestra que AAC y la CoAgT fueron mejores en la detección de las bacterias a concentraciones bajas. El análisis del laboratorio húmedo produjo resultados de los límites de detección de una tendencia similar, donde AAC, IF, PCR y CoAgT fueron 10^{-3} , 10^{-3} , 10^{-1} y 10^{-3} respectivamente, a partir de muestras de riñón de $9,9 \times 10^4$ CFU / g. En Hokkaido, se obtuvieron resultados positivos en la investigación epidemiológica con AAC. Estos resultados fueron corroborados por las

pruebas de IF, CoAgT y PCR en un mayor o menor grado, demostrando así la importancia de un enfoque multi-diagnóstico en situaciones de esta naturaleza.

Palabras claves: *Aeromonas salmonicida*, salmón, diagnóstico, límites de detección

Abstract

The success of the methods employed in the detection of *Aeromonas salmonicida* depends on several factors including detection limits which are not always considered when planning a diagnostic protocol. First, detection limits of *A. salmonicida* by Coomassie Brilliant Blue Agar (CBBA) culture, Immuno-Fluorescence Antibody Test (IFAT), Coagglutination test (CoAgT) and Polymerase Chain Reaction (PCR) were analyzed, then a controlled wet-lab experiment was conducted using 60 masu salmon (*Oncorhynchus masou*) fry inoculated with *A. salmonicida* and based on the results obtained, an epizootiological survey of selected rivers in Hokkaido was then conducted. Detection limits were 10^2 for CBBA, 10^4 for the IFAT, 10^5 for PCR and 10^3 for the CoAgT from an original de *A. salmonicida* broth culture of 1.3×10^8 CFU/mL demonstrating that CBBA and the CoAgT were better at detecting the bacteria at low concentrations. The wet-lab analysis produced results of detection limits of a similar trend, with CBBA, IFAT, PCR and CoAgT at 10^{-3} , 10^{-3} , 10^{-1} and 10^{-3} from kidney samples of 9.9×10^4 CFU/g respectively. The results from the epizootiological survey in Hokkaido showed positive from CBBA with IFAT, CoAgT and PCR corroborating them in varying degrees thus demonstrating the importance of a multi-diagnostic approach in scenarios of this nature.

Key words: *Aeromonas salmonicida*, salmon, diagnosis, detection limits

La alta demanda de salmón se ha traducido en una intensificación de la producción en criaderos e instalaciones de acuicultura. A medida que la industria ha crecido, se ha visto afectado por diversas enfermedades, tales como la forunculosis, que puede presentarse en formas asintomáticas a brotes repentinos y esporádicos (Håstein y Lindstad, 1991). Una población de peces silvestres aparentemente sanas con una tasa de portadores muy baja puede ser responsable de la infección por *A. salmonicida* de una gran parte de la población de piscifactoría, y grandes poblaciones de peces no portadores en cautividad puede ser fácilmente infectados sin evidencia clínica de enfermedad por un pequeño número de peces portadores ferales

(McCarthy, 1977). La necesidad de identificar y detectar de manera eficaz es de suma importancia, con muchos métodos que se emplean con mayores o menores éxitos, dependiendo de factores tales como la logística y la calidad de la muestra (de la Peña, 2001).

La elección de los métodos de detección sin embargo, no siempre se tiene en cuenta todos estos factores de una manera práctica, sino más bien se basa en gran medida en una noción preconcebida de que la prueba elegida es fiable e infalible debido al concepto de que su detección es sencillo (Bemoth *et al.*, 1997). Como resultado, surge un problema científico donde los investigadores rara vez buscan para comparar diferentes técnicas de diagnóstico, sino más bien, su intención es para mejorar el nivel de competencia de su ensayo preferido. Esto llega a ser extremadamente importante en los países en desarrollo, donde las instalaciones adecuadas son pocos y logístico eficiencia es baja. Es en este contexto que se tomó un enfoque imparcial para explorar cómo podemos llegar a conclusiones que nos permitan desarrollar pautas para los profesionales en el campo para seleccionar los métodos que sean compatibles con sus circunstancias locales y al mismo tiempo mantener la credibilidad de los resultados que se obtengan.

Para llevar a cabo de este estudio se seleccionaron cuatro técnicas ampliamente utilizadas: Agar Azul de Coomassie (AAC), la prueba de inmuno-fluorescencia (IF), la prueba de coaglutinación (CoAgT), y la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El propósito general fue comparar la eficacia de estos cuatro métodos en la detección de *A. salmonicida* basado principalmente en los límites de detección y evaluar su aplicabilidad en una encuesta epidemiológica en Hokkaido. Obteniéndose de esta manera datos adecuados para la elaboración de herramientas epizootiológicas eficaces para el diagnóstico de forunculosis.

Materiales y Métodos

En primer lugar, fueron analizados los límites de detección de *A. salmonicida* por cultivo, prueba serológica y PCR utilizando bacterias cultivadas en caldo ($1,3 \times 10^8$ UFC / mL) sometidos a la dilución serie. Luego, AAC, IF, PCR y CoAgT fueron hechos. Las muestras fueron almacenadas a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante seis meses y analizadas mensualmente. Igualmente, muestras preparadas fueron fijadas y las láminas almacenadas a temperatura ambiente, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente durante seis meses y IF fue realizado mensualmente. Además, la PCR se llevó a cabo utilizando 3 métodos de extracción: calor, fenol con proteinasa K/0.5% de Tween 20, y fenol con una solución de proteinasa K / SDS.

Con los datos del primer experimento, y el objetivo de estudiar el rendimiento de estas cuatro pruebas en el tejido. Un experimento controlado del laboratorio húmedo se realizó en la estación Continental de las Ciencias Acuícolas ubicado en Eniwa, Hokkaido, utilizando 60 alevines de salmón masu (*Oncorhynchus masou*) con un promedio de 21,5 g. Los alevines fueron divididos en 2 grupos: un grupo control (A) inyectado con 0,1 mL de 0,85% de solución de NaCl / pez y un grupo de prueba (B) inoculado con 0,1 mL / pez de $6,3 \times 10^3$ CFU / mL de la cepa de *A. salmonicida* aislado de una trucha de la montaña (*Salvelinus leucomaenis leucomaenis*) y se mantuvo durante seis días en tanques en 26.7°C. Muestras de riñones fueron homogenizados en nueve veces su volumen de PBS y sometidos a una serie de dilución. Luego, las pruebas AAC, IF, PCR y CoAgT fueron realizadas.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se llevó a cabo una investigación epidemiológica de ríos seleccionados en Hokkaido y luego se elaboró un protocolo de diagnóstico.

Resultados y Discusión

Colonias friables del color azul oscuro fueron obtenidos del ACC que demostraron que las condiciones para el cultivo de las bacterias eran ideales y no afectaban a la virulencia, permitiendo de este modo que la capa A de la proteína de este fenotipo para absorber el Azul de Coomassie, como se ha demostrado por Moki *et al.* (1995).

Se obtuvo un recuento de colonias de $1,3 \times 10^8$ CFU / mL, lo que coincide con los obtenidos por Cipriano (1997) y Nomura *et al.* (2002). De los cuatro métodos examinados, ACC señaló el mejor límite de detección de 10^2 UFC / mL seguido por 10^3 UFC / mL para la CoAgT, 10^4 UFC / mL para la IF y 10^5 UFC / mL para la prueba de PCR. Estos resultados demostraron que ACC, IF y la CoAgT fueron mejores en la detección de las bacterias a concentraciones bajas.

El producto de ADN amplificado por PCR fue consistentemente en un tamaño de 421 bp concordando con Gustafson *et al.* (1992) (Fig. 1). Los límites de detección fueron afectados drásticamente por almacenamiento sólo en la PCR con independencia del método de extracción empleado (fig. 2). Esto indica que cuando hay dificultades en la logística, en lugar de este método sería mejor elegir ACC, que pueden mantenerse a temperatura ambiente (Moki *et al.*, 1995; Cipriano, 1997) o la CoAgT, que es inmediatamente tratada por calor (Yoshimizu y Kimura, 1985). Los resultados de la PCR obtenidos, aunque aparentemente no deseados, son

muy útiles en muchos aspectos, ya que se demuestran que un resultado negativo puede ser debido a insuficiente CFU por 10 µL de una plantilla de PCR, como señala Gustafson *et al.* (1992) y Høie *et al.* (1997). Debe tenerse en cuenta que el uso de la PCR en el diagnóstico de *A. salmonicida* siempre ha producido resultados contradictorios y variados entre diferentes investigadores. Esto demuestra que se necesitan más estudios para llegar a un acuerdo de diagnóstico en este sentido (Balcázar *et al.*, 2007).

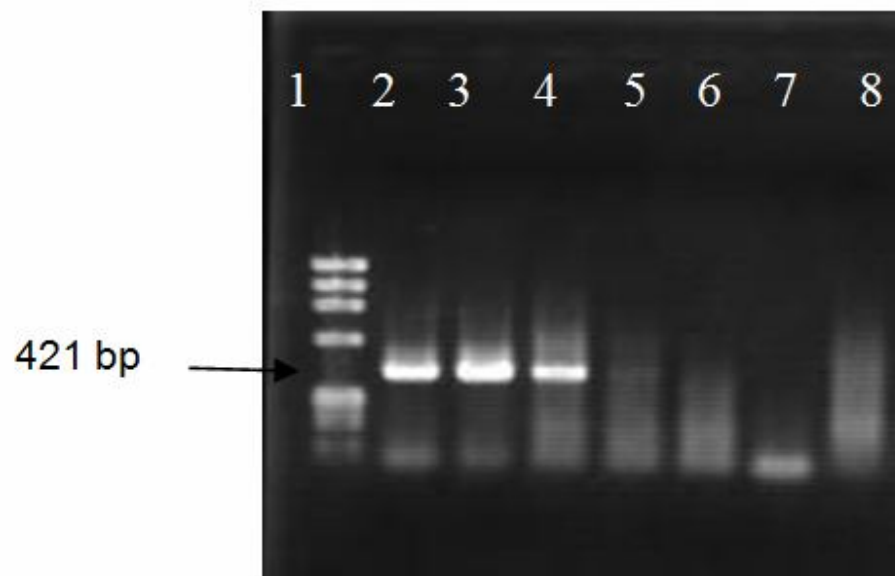


Figura 1. Perfil en gel de agarosa de los productos de PCR mediante una serie de dilución. [De izquierda a derecha: marcador (columna 1), 10^{-1} - 10^{-6} (columna 2 - 7, respectivamente) y el control negativo (columna 8)].

El deterioro con el tiempo de las diapositivas fijadas inicialmente fue mínima, lo que indica que es ideal para la detección de *A. salmonicida* cuando el procesamiento inmediato de las muestras no es posible (AFFA, 2001). Shibata *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares en un estudio llevado a cabo mediante la comparación de muestras preparadas en contra de las muestras almacenadas cuando se estudian SYBR Green I y SYBR Gold manchas.

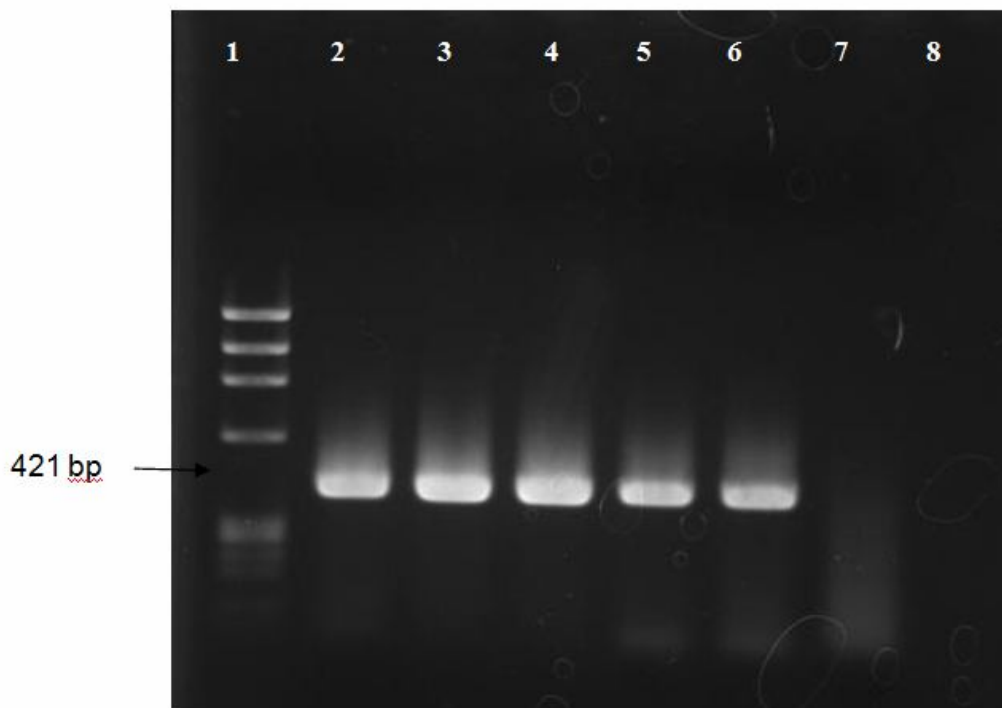


Figura 2. Perfil en gel de agarosa de productos de PCR después de 2 meses de almacenamiento. [De izquierda a derecha: el marcador (columna 1), 10^{-1} [-85°C], 10^{-1} [-30 °C], 10^{-2} [-85°C], 10^{-2} [-30 °C], 10^{-3} [-85°C], 10^{-3} [-30°C] (columnas 2-7, respectivamente) y el control negativo (columna 8)].

Todos los peces del grupo de control fueron negativos. En el grupo de prueba, se obtuvo 13,3% de mortalidad y el post mortem reveló esplenomegalia y hemorragias. Ellos fueron clasificados a causa de la forunculosis en su forma subaguda (Cipriano y Bullock, 2001b; Crawford, 2001).

Los siguientes resultados positivos se registraron: ACC 13/30 (43,3%), IF 30/30 (100%), la PCR 1/30 (3,3%) y CoAgT 30/30 (100%). Los límites de detección de muestras de riñón con $9,9 \times 10^4$ UFC / g de *A. salmonicida* siguieron una tendencia similar a los resultados obtenidos en el primer experimento con ACC, IF y CoAgT; siendo mejores que la PCR con independencia del método de extracción empleado. Los resultados de la PCR indican que las reacciones no específicas de uso directo de los tejidos pueden haber sido un factor limitante. Se ha observado también que una porción relativamente pequeña del riñón se usa y posiblemente

no siempre es lo suficientemente representativa para producir un resultado positivo como se ha señalado por Gustafson *et al.* (1992) y Høie *et al.* (1997) y sugiere que no se debe emplear en peces asintomáticos si no es seguido por otros métodos tales como la IF. Los resultados obtenidos indican que es posible que los cebadores no sean tan excelentes para las muestras de tejido como se había informado previamente. Byers *et al.* (2002) y Beaz-Hidalgo *et al.* (2007) corroboran este hecho cuando encontraron el AP-1/AP-2 falsamente reportada *A. salmonicida* como negativas.

Además, los resultados indicaron que ACC es un buen indicador preliminar en la presencia de la enfermedad, pero no debe considerarse como concluyente ya que *A. salmonicida* no puede crecer cuando está en la presencia de otras bacterias competitivas tales como *Pseudomonas fluorescens*. Además, la torunda puede no haber sido lo suficientemente representativo. Esto fue demostrado por True (2001), quien encontró que cuando el tamaño del tejido renal que se utiliza para inocular *A. salmonicida* en placas BHIA era más grande, el número de colonias y el número de pruebas de cultivo positivos aumentó. Ese estudio mostró que los individuos positivos podrían perderse por este motivo. Høie *et al.* (1997) llegaron a la misma conclusión al evaluar un ensayo basado en PCR para la detección de *A. salmonicida* y se encontró con resultados discordantes entre las muestras duplicadas de los riñones de los peces desafiados experimentalmente.

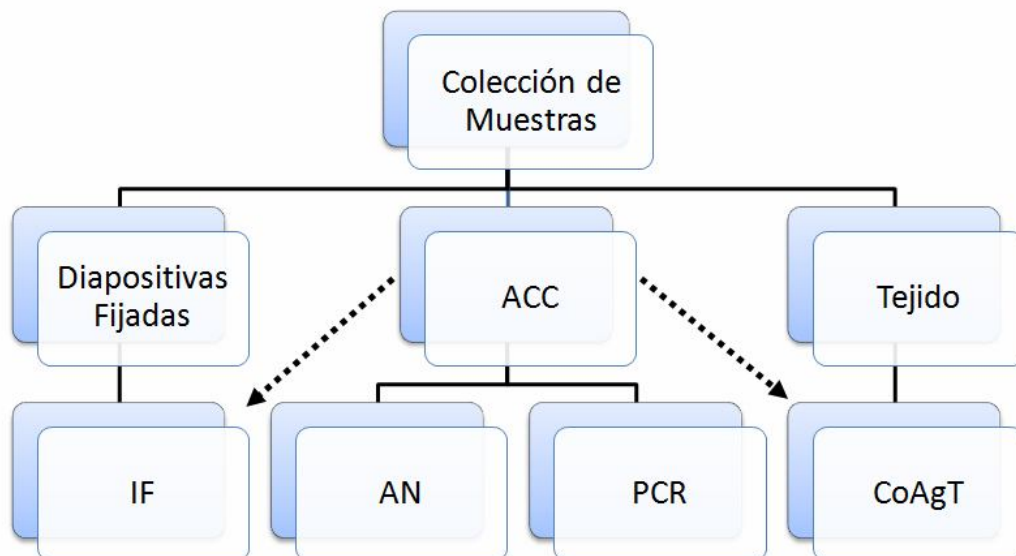


Figura 3. Propuesta de Protocolo de diagnóstico.

El protocolo de diagnóstico propuesto, como se muestra en la figura. 3, se basa en los resultados colectivos de los ensayos realizados sobre *A. salmonicida* cultivado y los tejidos del experimento controlado del laboratorio húmedo, que fue aplicado a una investigación epizootiológica realizada en Hokkaido, mostraron consistencia entre todas las pruebas con resultados positivos de ACC corroborados por IF, CoAgT y PCR.

El protocolo recomienda la recogida de muestras de tejidos, preparación de portaobjetos de vidrio (AFFA, 2001) y el rayado de ACC en el sitio. La recomendación de tener ACC sembrados inmediatamente en el sitio coincide con las conclusiones de True (2001) que mostraron que las infecciones de bajo nivel podrían perderse si las muestras se colocaron en placas a 24 horas, y Cipriano y Bullock (2001a), que reportó un aumento en la detección en muestras diluidas en los ensayos *in situ* en contraste a cuando se hace después de haber sido transportado a un laboratorio. IF y CoAgT pueden llevarse a cabo sin la necesidad de una cultura aislamiento primario, por lo tanto son valiosos para la detección inicial / presuntiva y rápida de *A. salmonicida* en el campo, y junto con la PCR son útiles para corroborar colonias sospechosas encontradas en cultivos de ACC.

Mucha importancia se coloca en ACC porque es simple, sensible y de bajo costo (Cipriano, 1997). Además, puede servir como copia de seguridad si hay problemas y / o inconsistencias en el proceso de diagnóstico. IF y CoAgT pueden llevarse a cabo sin la necesidad de una cultura aislamiento primario, por lo tanto el diagnóstico rápido se puede lograr (Adams y Thompson, 1990).

Aunque las pruebas de PCR han aumentado la sensibilidad, son caros, no es simple y no es fácil de aplicar (Hiney *et al.*, 1997). Aunque la recomendación de Gustafson *et al.* (1992) para realizar un paso consecuencia de caldo para eliminar los resultados falsos negativos de PCR mediante ensayos directos es bueno, nuestro protocolo sólo utiliza PCR a partir de cultivos obtenidos a través de ACC basado en el costo y la complejidad de los equipos necesarios (de la Peña, 2001). Por lo tanto la PCR se convierte en un mecanismo para corroborar los resultados obtenidos a partir de ACC. Agar nutritivo (AN) es adecuado para el aislamiento de las colonias sospechosas así obteniendo de este modo colonias más puras que sirven para observar el desarrollo de la pigmentación marrón (Griffin, 1953).

Se concluyó que múltiples procedimientos de diagnóstico tales como ACC, CoAgT, IF y PCR pueden ser utilizados para corroborar entre sí, dando así un indicador fiable de la situación epidemiológica de la forunculosis y puede servir como un mecanismo de copia de seguridad si

hay un fallo en cualquier etapa dada del diagnóstico y la desventaja de bajos límites de detección se pueden superar siempre y cuando este sea el caso.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Sr. Makoto Hatakeyama de la estación Continental de Hokkaido de las Ciencias Acuícolas y Dr. Tetsuichi Nomura, por su apoyo para el éxito de esta investigación.

Referencias

- Adams, A. and K. Thompson (1990) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. *Journal of Aquatic Animal Health* **2**, 281-288
- Agriculture, Fisheries and Forestry Australian [AFFA], (2001) Disease Strategy: Furunculosis. In "Australian Aquatic Veterinary Emergency Plan (AQUAVETPLAN)" Department of Agriculture, Fisheries and Forestry - Australia, Canberra, ACT. 72
- Balcázar, J., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Gironés and J. Múzquiz (2007) Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by rea-time PCR using sel-quenched, fluorogenic primers. *Journal of Medical Microbiology* **56**, 323-328
- Beaz-Hidalgo, R., G. Magi, S. Balboa, J. Barja, and J. Romalde (2007) Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene, *Veterinary Microbiology*, doi: **10**,1016
- Bemeth, E., A. Ellis, P. Midtlyng, G. Olivier and P. Smith (1997) Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research . Academic Press Limited. London. pp. 109
- Byers H., N. Gudkovs and M. Crane (2002) PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. I. Evaluation of three PCR primer sets for detection and identification. *Diseases of Aquatic Organisms* **49**, 129-138
- Cipriano, R. (1997) Strategies for management of furunculosis in Atlantic salmon effected by non-lethal detection by *Aeromonas salmonicida*: A review. *Bulletin European Association Fish Pathology* **17** (6), 215
- Cipriano, R. and G. Bullock (2001a) Evaluation of commercially prepared transport systems for nonlethal detection of *Aeromonas salmonicida* in Salmonid fish. *Journal of Aquatic Animal Health* **13** (2), 96-104
- Cipriano, R. and G. Bullock (2001b) Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. Fish Disease Leaflet 66. United States Geological Survey. pp. 33

- Crawford, S. (2001) Salmonine Introductions to the Laurentian Great Lakes: An Historical Review and Evaluation of Ecological Effects. *Canadian Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* **132**, 205
- de la Peña, L. (2001) Immunological and molecular biology techniques in disease diagnosis. In "*Health management in Aquaculture*" (Ed. by L. Gilda, C. Lavilla and E. Cruz-Lacierda) SEAFDEC, Philippines. pp. 143-156
- Griffin, P. (1953) Pigment formation by *Bacterium salmonicida*. *Journal of Bacteriology* **65**, 652 – 659
- Gustafson, C., C. Thomas and T. Trust (1992) Detection of *Aeromonas salmonicida* from Fish by Using Polymerase Chain Reaction Amplification of the Virulence Surface Array Protein Gene. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (12), 3816-3825
- Hastein, T. and T. Lindstad (1991) "Diseases in wild and cultured salmon: possible interaction," *Aquaculture* **98**, 277–288
- Hiney, M., P. Smith and E. Bernoth (1997) Covert *Aeromonas salmonicida* infections. In "*Furunculosis*" (Ed. by E. Bernoth, A. Ellis, P. Midtlyng, G. Olivier and P. Smith) Multidisciplinary fish disease research, Academic Press, London. pp 54-97
- Høie, S., M. Heum and O. Thoresen (1997) Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Aeromonas salmonicida* ss *salmonicida* in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* **30**, 27-35
- McCarthy, D. (1977) Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen – *Aeromonas salmonicida*. In "*Aquatic Microbiology Society of Applied Bacteriology Symposium*" (Ed. by F. Skinner and J. Shewan). Ser.6, Academic Press, London. pp. 29-324
- Moki, S., T. Nomura and M. Yoshimizu (1995) Effect of incubation-temperature for isolation on auto-agglutination of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathology* **30** (1): 67-68
- Nomura, T., H. Honma, H. Kasai and M. Yoshimizu (2002) Isolation of *Aeromonas salmonicida*, causative agent of Furunculosis, from Chum salmon caught in the river or coast. *Bulletin Fisheries Science, Hokkaido University* **53** (1): 45-50
- Shibata, A., Y. Goto, H. Saito, T. Kikuchi, T. Toda and S. Taguchi (2006) Comparison of SYBR I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy. *Aquatic Microbiological Ecology Vol.* **43**, 223-231
- True, K. (2001) Comparative study of the sensitivity of bacterial culture of *Aeromonas salmonicida* from individual and five-fish pool samples from naturally infected Lahanton cutthroat trout. Nevada Fish Health Centre, California. pp. 1-3

Yoshimizu, M. and T. Kimura (1985) A coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral diseases of fish, *Fish Pathology* **20** (2/3): 243-261

REDVET: 2014, Vol. 15 N° 6

Este artículo Ref. prov. JUN1405 y Ref. def. 061405_RED VET) está disponible en
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060614.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060614/051405.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con **Veterinaria.org®** <http://www.veterinaria.org> y con
REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>