

Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú

Rapid diagnosis and identification by PCR of *Yersinia ruckeri* isolated of *Oncorhynchus mykiss* from Canta, Lima, Peru

Susana Sirvas-Cornejo*, Claudia Cecilia Sánchez-Robinet y César Peña-Domínguez

Laboratorio de Biología Molecular;
Departamento Académico de

Acuicultura, Facultad de Oceanografía, Pesquería y Ciencias

Alimentarias; Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle Roma 350, Miraflores, Lima 18, Perú.

Email Susana Sirvas Cornejo: sirvascornejo@yahoo.com

Email Claudia Sánchez Robinet: sanchezrobinet@hotmail.com

*Autor para correspondencia

Resumen

Se muestrearon 20 ejemplares (alevinos y juveniles) de trucha arco iris cultivados en la piscifactoría Acochinchán (Canta, Lima, Perú), y se les aplicó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la finalidad de obtener una identificación rápida del agente patógeno *Yersinia ruckeri* que produce la enfermedad entérica de la boca roja (ERM) y genera elevadas tasas de mortalidad. Nueve ejemplares fueron asintomáticos mientras que 11 presentaron signos de ERM. Se aislaron 22 cepas bacterianas del hígado, bazo y riñón. Se empleó la técnica de la PCR para la amplificación y cebadores específicos (ARNr 16S), que permitieron amplificar un fragmento de ADN de 575 pb de *Yersinia ruckeri*. Diecinueve cepas fueron identificadas como *Yersinia ruckeri* mediante la PCR, tanto en peces sintomáticos como asintomáticos. Se estableció un tiempo de diagnóstico de 26 horas, en comparación con los 2 ó 3 días que duraría el diagnóstico empleando las pruebas bioquímicas.

Palabras Clave: *Yersinia ruckeri*, *Oncorhynchus mykiss*, PCR, diagnóstico, Enfermedad Entérica de la Boca Roja.

Abstract

Twenty individuals of rainbow trout were sampled (fry and juveniles) from Acochinchán Fishfarm (Canta, Lima - Peru), and analyzed with the Polymerase Chain Reaction test (PCR) in order to achieve a rapid identification of *Yersinia ruckeri*, which is the pathogen agent that causes the enteric red mouth disease (ERM) and produces high rates of mortality. Nine fish samples were asymptomatic, while 11 of them showed signs of ERM. In addition, 22 bacterial strains were isolated from the liver, spleen and kidney. PCR and specific primers (16S rRNA), were used to amplify a specific 575 bp DNA fragment of *Yersinia ruckeri*. Nineteen strains were identified as *Yersinia ruckeri* by PCR in symptomatic and asymptomatic fishes. It was established a diagnosis time of 26 hours, compared with the 2 or 3 days that would take the diagnosis using biochemical tests.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, *Oncorhynchus mykiss*, PCR, diagnosis, Enteric Red Mouth Disease.

Presentado: 08/07/2011
Aceptado: 10/10/2011
Publicado online: 08/02/2012

Introducción

La Enfermedad Entérica de la Boca Roja, ERM (Enteric Redmouth Disease), es una infección sistémica de curso crónico y agudo y que afecta principalmente a la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Rodgers 1991), y genera elevadas tasas de mortalidad ocasionando importantes pérdidas económicas (Austin 1993). Esta infección es producida por *Yersinia ruckeri* aislada por primera vez, en el Valle Hagerman (USA) a principios del 1950 (Rucker 1966, Ross et al. 1966). Además ha sido reportada en Australia (Bullock et al. 1977), Iran (Soltani et al. 1999), Turquía (Timur & Timur 1991), Portugal (Sousa et al. 1996), Sudáfrica (Bragg & Henton 1986, Bragg 1991), China (Raidal et al. 2004), Francia (Lesel et al. 1983), Reino Unido (Austin et al. 2003) entre otros países. En Perú, *Y. ruckeri* fue aislada de 34 piscifactorías del departamento de Junín en el año 2004 utilizando procedimientos bioquímicos estándares (Bravo & Kojagura 2004). En ese trabajo, inicialmente se realizaron identificaciones presuntivas a través de tinción Gram, actividad de la oxidasa, motilidad, y reacción a la prueba O/F; posteriormente la confirmación de *Y. ruckeri* se realizó en Chile mediante una reacción de aglutinación con el antisuero Tipo I.

El cultivo de trucha arco iris es una actividad económica importante en el Perú, según reporte del Ministerio de la Producción (2010). De las 17,320 TM procedentes de la acuicultura continental, 14,250 TM corresponden al cultivo de trucha (PRODUCE 2010).

Yersinia ruckeri se transmite de manera horizontal es decir a través del agua, por las deyecciones de los peces infectados o portadores al pez susceptible (Rodger 1991). La ERM se caracteriza por hemorragias en la boca y alrededores, presencia de zonas hemorrágicas en la superficie del cuerpo e inflamación en la base de las aletas, opérculos, paladar (Bullock & Cipriano 1990). La ERM también ha sido referida como Yersiniosis ya que no siempre los peces afectados presentan las características áreas enrojecidas de la boca (Frerichs et al. 1985, Inglis et al. 1993). Asimismo, este término es usado para distinguir una infección crónica en comparación con la ERM que se muestra de forma aguda (Carson & Wilson 2009).

También se puede presentar exoftalmia con hemorragias en el orbital (Rucker 1966, Horne & Barnes 1999, Avci & Birincioğlu 2005). Además, presentan un oscurecimiento de la piel y distensión abdominal, se pueden observar cambios en el comportamiento de los peces, como nado cerca de la superficie y movimientos lentos. Con frecuencia, los peces afectados se encuentran en estado de letargo y en áreas con bajo flujo de agua, además a menudo pierden el apetito. Esta enfermedad puede afectar a los peces de todas las etapas de cultivo, pero es más aguda en alevinos. En peces de mayor tamaño, la enfermedad aparece de manera crónica (Avci & Birincioğlu 2005).

El cultivo de peces en condiciones intensivas genera factores de estrés, ligados a las propias condiciones de producción, a las altas densidades del cultivo y a la calidad del agua, favoreciendo

así la aparición de enfermedades infecciosas y toxicológicas (Reno 1998).

La sintomatología y lesiones de las enfermedades infecciosas de los peces carecen de la especificidad suficiente como para establecer un diagnóstico definitivo del posible agente patógeno (Gibello et al. 2001).

La identificación definitiva de *Y. ruckeri* por los métodos microbiológicos tradicionales (como siembra en placa e incubación para obtener un cultivo joven, luego siembra en medios de cultivo conteniendo sustratos específicos como aminoácidos, carbohidratos, entre otros, para observar las reacciones bioquímicas de la cepa) duran de 2 a 3 días. Además la identificación con el sistema API 20E debe ser interpretada con precaución porque en ocasiones se ha confundido con el perfil de *Hafnia alvei* (Furones et al. 1993). Por otro lado, la técnica de PCR es un sistema de diagnóstico clínico que permite la identificación fiable y específica del agente etiológico *Y. ruckeri* en menor tiempo (Gibello et al. 2001).

El presente trabajo reporta la presencia de *Y. ruckeri* en *Onchorhynchus mykiss* en piscigranjas de Canta, Lima, utilizando la técnica de la PCR.

Materiales y métodos

Muestreo.- Se recolectaron 20 ejemplares (8 alevines y 12 juveniles) de trucha arco iris provenientes de los estanques de cultivo de la Piscigranja Acochinchán, Lima (Distrito de Huaros, Canta, 3333 m de altitud), de los cuales 11 ejemplares presentaron signos de enfermedad (Yersiniosis o ERM) mientras que 9 ejemplares asintomáticos fueron muestreados como control. Asimismo, se determinó la temperatura y pH del agua.

Aislamiento de cepas.- Con el fin de aislar al patógeno se realizaron disecciones asépticas de los peces. Se empleó el método de estrías para aislar cepas bacterianas del hígado, bazo y riñón.

Estas cepas fueron incubadas en placas con Agar Tripticasa de Soya (TSA). Los parámetros óptimos de temperatura y tiempo de incubación en placa fueron de 20 a 22 °C durante 18 horas.

Yersinia ruckeri.- El Área de Investigación Experimental de Patobiología Acuática, de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV) perteneciente a la Facultad de Oceanografía, Pesquería y Ciencias Alimentarias (FOPCA), cedió una cepa de *Yersinia ruckeri*, la cual había sido aislada de truchas arco iris de la laguna de Paucarcocha, Lima, Distrito de Tanta - Provincia de Yauyos, a una altitud de 4284 m. La identificación de esta cepa fue confirmada por pruebas bioquímicas y empleada como control positivo.

Extracción de ADN.- Las extracciones de ADN se efectuaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Oceanografía, Pesquería y Ciencias Alimentarias, UNFV, empleando el *Kit AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA*. El ADN de cada cepa aislada se obtuvo incubando previamente la cepa en Caldo Tripticasa de Soya (TSB). Además, en cada lote de reacción se empleó un blanco de extracción del Kit. Por otro lado, se escogió al azar una cepa identificada como *Yersinia ruckeri* por la técnica de PCR y se cultivó a diferentes tiempos de incubación (6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 h). Luego se realizaron extracciones de ADN y PCR a cada uno de los cultivos con el objeto de determinar el menor tiempo de diagnóstico.

Amplificación de ADN (PCR).- Se utilizaron los cebadores YER8 (5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG- 3') y YER10 (5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG- 3') correspondientes al ADN del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal bacteriano (ARN 16S) (Gibello et al. 1999). Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen de 25 µL de reacción conteniendo: 1 µL de ADN (diluido 1/100) extraído de la cepa bacteriana, 10 µm de cada *primer* (Eurofins MWG Operon), 2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (Fermentas), 5 µL del



Figura 1. Signos externos. Oscurecimiento de la piel (a); boca roja (b); distensión abdominal (c); secreciones (d); exoftalmia (e).

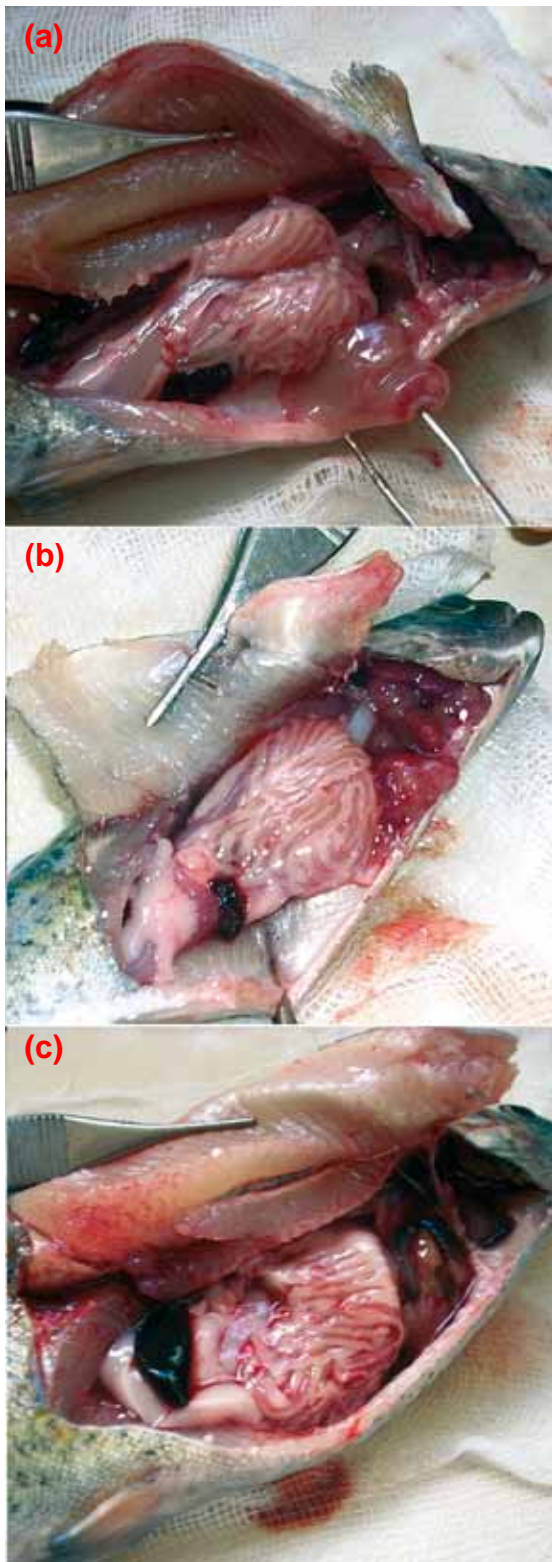


Figura 2. Hígado pálido y hemorrágico (a); bazo normal (b); bazo esplénico (c).

buffer Taq polimerasa (*Fermentas*) y 5 U/μL de *Taq* polimerasa (*Fermentas*). La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems (Modelo M-201) por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, anillamiento a 61,8 °C por 1 min, elongación a 72 °C por 1 min. Previamente una desnaturalización inicial a 92 °C por 5 min y posteriormente una elongación final a 72 °C por 8 min. En cada lote de reacción de PCR se empleó como control negativo a las cepas de

Aeromonas salmonicida (proveída por el Área de Investigación de Patobiología Acuática FOPCA, UNFV), *Flavobacterium* sp. (proveída por el Laboratorio de Biología Molecular – FOPCA, UNFV) y *Escherichia coli* (proveída por el Laboratorio de Microbiología – FOPCA, UNFV).

Resultados

Signos patológicos.– Los especímenes enfermos (alevines y juveniles) de trucha arco iris analizados en este estudio mostraron signos evidentes y frecuentes como exoftalmia y oscurecimiento de la piel (Fig. 1a y e), distensión abdominal (Fig. 1c) y secreciones (Fig. 1d) así como inflamación en la base de las aletas y paladar. Sin embargo, la característica más distintiva de la ERM, fue la clásica “boca roja” (Fig. 1b).

Otras características adicionales fueron inapetencia, letargia, nado cerca de la superficie con movimientos lentos o permanencia cerca de la salida del agua. La Figura 2 muestra los signos clínicos más relevantes que afectan a los órganos internos como: esplenomegalia del bazo, palidez y hemorragias en el hígado.

Características del cultivo bacteriano.– A partir de las muestras patológicas se lograron aislar en el medio de cultivo TSA un total de 22 cepas, las cuales mostraron características de colonia algo similares. Dichas colonias presentaron un tamaño comprendido entre 0,5 a 2 mm de diámetro, circulares, lisas, ligeramente convexas, y translúcidas ante la luz natural con un color blanco cremoso.

Amplificación de ADN.– Las muestras que mostraron la amplificación de un fragmento de ADN de 575 pb, de acuerdo con el tamaño esperado, fueron consideradas positivas.

Se confirmó la presencia de *Y. ruckeri* en 19 truchas arco iris de un total de 20 ejemplares colectados, de los cuales 11 ejemplares presentaron signos patológicos siendo los demás asintomáticos. La especificidad de esta prueba fue corroborada con la PCR de *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium* sp. y *Escherichia coli*, ninguna de las cuales mostró ADN amplificado con los cebadores descritos YER8 y YER10 (Fig. 3) confirmándose su especificidad para amplificar *Y. ruckeri*.

La figura 4 muestra ADN amplificado de *Y. ruckeri*, donde se puede apreciar que una de las muestras resultó negativa producto de una trucha asintomática.

La técnica de PCR es tan sensible que aún habiendo disminuido el tiempo de incubación de la cepa de 18 a 6 horas, se pudo detectar el patógeno en las muestras estudiadas (Fig. 5).

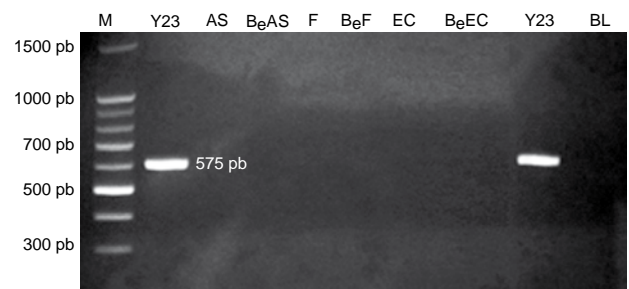


Figura 3. M: Ladder, Y23: *Yersinia ruckeri* (control positivo), AS: *Aeromonas salmonicida*, BeAS: Blanco de extracción (Kit) para *A. salmonicida*, F: *Flavobacterium* sp., BeF: Blanco de extracción (Kit) para *Flavobacterium* sp., EC: *Escherichia coli*, BeEC: Blanco de extracción (kit) para *E. coli*, BL: Blanco de PCR.

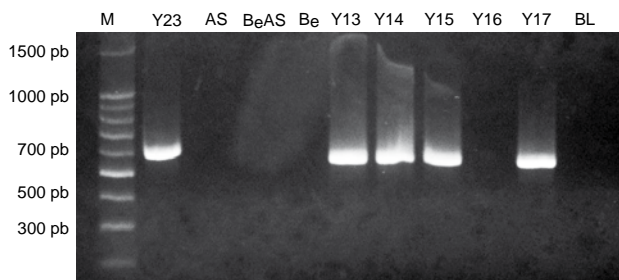


Figura 4. M: Ladder, Y23: *Yersinia ruckeri* (control positivo), AS: *Aeromonas salmonicida*, BeAS: Blanco de extracción (kit) para *A. salmonicida*, Be: Blanco de extracción para muestras (kit), Y13 al Y15: Muestras (+): *Yersinia ruckeri*, Y16: Muestra (-): No identificada, Y17: Muestra (+): *Yersinia ruckeri*, BL: Blanco de PCR.

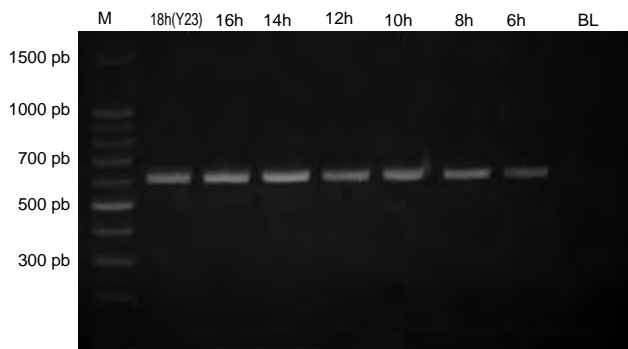


Figura 5. M: Ladder, 18h(Y23): control positivo (18h de incubación), 16h: *Y. ruckeri* (16 h de incubación), 14h: *Y. ruckeri* (14 h de incubación), 12h: *Y. ruckeri* (12 h de incubación), 10h: *Y. ruckeri* (10 h de incubación) 8h: *Y. ruckeri* (8h de incubación), 6h: *Y. ruckeri* (6h de incubación), BL: Blanco de PCR.

Discusión

A pesar que han sido descritos métodos de PCR de alta sensibilidad capaces de detectar menos de 20 UFC por gramo de órgano (Gustafson et al. 1992, Wiklund et al. 2000) esta sensibilidad es bastante menor a la obtenida a partir de ADN purificado o de microorganismos aislados. Esta reducción en la sensibilidad de la técnica se atribuye a la existencia de sustancias inhibitoras en los tejidos y órganos de los animales como la hemoglobina y proteínas séricas de la sangre, grasas y glicógeno, así como también determinados reactivos añadidos durante el procesamiento de la muestra (Wilson 1997). No obstante, las sustancias que inhiben la reacción de PCR actúan interfiriendo la lisis del microorganismo necesaria para la liberación del ácido nucleico a amplificar, degradando o capturándolo e inhibiendo la actividad de la polimerasa. En el presente estudio se amplificó el ADN total a partir de cepas bacterianas aisladas, mientras que otros autores como Gibello et al. (1999) y Kirkan et al. (2006), amplificaron el ADN a partir de tejidos homogenizados.

Los ensayos de PCR no diferencian entre ADN procedente de células vivas o muertas (Hiney & Smith 1998), como la amplificación del ADN de bacterias muertas tras un tratamiento efectivo con un antibiótico o en animales vacunados con microorganismos inactivados. El método de diagnóstico del presente estudio se puede realizar en peces previamente vacunados o en tratamiento con cualquier tipo de antibiótico ya que la detección es a partir de cepas aisladas en vez de tejidos y se confirma la presencia de la bacteria patógena en su forma viable.

La detección de portadores asintomáticos es muy importante para prevenir la transmisión y propagación de la ERM (Leclercq et al. 1989). Diferentes investigadores (Bush & Lingg 1975, Hunter et al. 1980) han demostrado exitosamente la detección de patógenos en peces infectados asintomáticos. En los estudios realizados por Gibello et al. (1999), Altinok et al. (2001), Kirkan et al. (2006), se utilizó la PCR para detectar la presencia de *Y. ruckeri* en peces infectados natural y artificialmente, y en nuestro estudio se empleó además de la PCR, métodos microbiológicos para aislamiento de cepas logrando detectar *Y. ruckeri* tanto en peces con signos de la Enfermedad Entérica de la Boca Roja, como en peces asintomáticos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al IRD (Institut de Recherche pour le Développement) por el apoyo brindado dentro del marco del convenio UNFV-IRD. Además un especial agradecimiento a la Piscigranja Acochinchán, al Dr. Fernando Carvajal V. por su valioso aporte, a Edmundo Guzmán y a todos los colaboradores que hicieron posible la ejecución del presente estudio.

Literatura citada

- Altinok I., J.M. Grizzle & Z. Liu. 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 44: 29-34.
- Austin B. & Austin D. A. 1993. Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish (Ellis Horwood Limited, Chichester United Kingdom, 2nd ed. pp 208 – 216.
- Austin D.A., P.A.W Robertson & B. Austin. 2003. Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Systematic and Applied Microbiology* 26: 127-131.
- Avci H. & S.S. Birincioğlu. 2005. Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29: 1321-1328.
- Bragg R.R. 1991. Health status of salmonids in river systems in Natal (South Africa). III. Isolation and identification of bacteria. *Onderstepoort J. Vest. Res.* 58: 67-70.
- Bragg R.R. & M.M Henton. 1986. Isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in South Africa. *Bulletin European Association of Fish Pathologist* 6: 5-6.
- Bullock G. L. and R. C. Cipriano. 1990. Enteric Redmouth Disease of Salmonids. *Fish Disease Leaflet* 82. UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR Fish and Wildlife Service: 1-4.
- Bullock G.L., H.M. Struckey & E.B.Jr. Shotts. 1977. Early records of North American and Australian outbreaks of enteric redmouth disease. *Fish Health News* 6(2): 96.
- Bravo S., & V. Kojagura. 2004. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 24: 104-108.
- Carson J. & T. Wilson. 2009. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure Manual. Pp: 1-18.
- Frerichs G.N., J.A. Stewart & R.O. Collens. 1985. Atypical infection of rainbow trout, (*Salmo gairdneri*, Richardson), with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 8: 383-387.
- Furones M.D., Rodgers C.J. & C.B. Munn. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Disease* 3: 105-125.
- Gibello A., M.M. Blanco, M.A. Moreno, M.T. Cutuli, A. Domenech, L. Domínguez & J.F. Fernández-Garayzabal. 1999. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 346-350.

- Gibello A., M.M. Blanco, M.A. Moreno, L. Domínguez, L. & J.F. Fernández-Garayzabal. 2001. Utilización de la PCR para el diagnóstico en Ictiopatología. *Revista AquaTiC* 15: 1-16
- Gustafson C.E., C.J. Thomas & T.J. 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: 3816-3825.
- Hiney M.P. & P.R. Smith. 1998. Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: framework, problems and possible solutions for environmental applications. *Aquaculture* 162: 41-68.
- Horne M.T. & A.C. Barnes. 1999. Enteric redmouth disease (*Y. ruckeri*). In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections* (ed. by P.T.K. Woo & D. W. Bruno), Pp. 455-477. CABI Publishing, Oxfordshire, U. K.
- Hunter V.A., M.D. Knittel & J.L. Fryer. 1980. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Journal of Fish Diseases* 3: 467-472.
- Inglis V., R.J. Roberts & N.R. Bromage. 1993. Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections of fish. In: *Bacterial Diseases of Fish*. Pp: 80 -105.
- Kirkan Ş., E.O. Göksoy, S. Tekbiyik, & O. Kaya. 2006. Detection of *Yersinia ruckeri* by PCR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* – Walbaum) hatchery farms in the west of Turkey. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.* 32(3): 21-30.
- Leclereq A., G. Wauters, J. Decallonne, M. El-Lioui & J. Vivegnis. 1996. Usefulness of cellular fatty acid patterns for identification and pathogenicity of *Yersinia* species. *Med. Microbiol. Let.* 5: 182-194.
- Lesel R., M. Lesel, F. Gavini & A. Vuillaume. 1983. Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow trout. *Salmo gairdneri* Richardson, in France. *J. Fish Dis.* 6: 385-387.
- PRODUCE (Ministerio de la Producción, Perú). 2010. Viceministerio de Pesquería. Información Anual de Pesca. Acuicultura. Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según ámbito y especie, 2010.
- Raidal S., G. Cross, S. Fenwick, P. Nicholls, B. Nowak, K. Ellard & E. Stephens. 2004. *Aquatic Animal Health: Exotic Disease Training Manual*. FRDC Project 2002/645. Pp: 40-42.
- Reno P.W. 1998. Factors involved in the dissemination of disease in fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 160-171.
- Rodgers C.J. 1991. The Control of enteric redmouth disease in Fish. *Trouts News* 12: 27-30.
- Ross A.J., R.R. Rucker & W.H. Ewing. 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology*. 12: 763-770.
- Rucker R. 1966. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin de L'Office International des Epizooties* 65: 825-830.
- Soltani M., F. Fadaiifard & M.R. Mehrabi. 1999. First report of yersiniosis-like infection in farmed rainbow trout. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 23: 173-176.
- Sousa J.A., J.L. Romalde, A. Ledo, J.C. Eiras, J.L. Barja & A.E. Toranzo. 1996. Health status of salmonid aquaculture in North Portugal. First detection of IPN virus. *Journal of Fish Diseases* 19: 83-89.
- Timur G. & M. Timur. 1991. An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 11: 182-183.
- White T.J., R. Madej & D.H. Persing. 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.* 29: 161-196.
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741-3751.
- Wiklund T., L. Madsen, M.S. Bruun & L. Dalsgaard. 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology* 88: 299-307.