

Opracowanie i ocena testu ELISA do wykrywania *Renibacterium salmoninarum* u ryb łososiowatych

ALICJA KOZIŃSKA, AGNIESZKA PĘKALA

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kozińska A., Pękala A.

Investigating and evaluating the ELISA test in detecting *Renibacterium salmoninarum* in salmonid fish

Summary

The aim of the study was to initially evaluate the diagnostic values of the ELISA test and its optimal parameters in detecting *Renibacterium salmoninarum* in fish. The time and the temperature of the plate coating as well as antigen incubation and conjugate concentration were standardized. A total of 130 positive and negative samples and 60 unknown samples from farmed fish were used in evaluating the tests. Additionally, the culture method and the commercial ELISA K-Dtect test were used to examine the unknown samples. The following reaction conditions were established: coating of microtiter plate in room temperature for 2h and incubation in 4°C by 24h, antigen incubation for 2h, conjugate concentration 1:2000. The ELISA test was capable of detecting 10^4 - 5×10^4 cell/ml. No cross reactivity between the 13 bacterial isolates were observed. The levels of accuracy, diagnosis specificity and sensitivity were estimated as being 96%, 97% and 96%, respectively. 19 out of a total of 60 tissue samples were positive in the ELISA test. A 95% and 96% level of diagnostic capability was estimated when the results were compared with the K-Dtect ELISA and culture method, respectively. The ELISA test appeared to be very useful for detecting *R. salmoninarum* in fishes internal organs.

Keywords: BKD, *Renibacterium salmoninarum*, Micrococcaceae

Renibacterium salmoninarum jest czynnikiem etiologicznym bakteryjnej choroby nerek (BKD), jednej z najważniejszych bakteryjnych chorób występujących u ryb łososiowatych, tak hodowlanych, jak i dziko żyjących (6). Jest to mała ($0,3$ - $1,0 \times 1,0$ - $1,5 \mu\text{m}$), Gram-dodatnia pałeczka nie wykazująca ruchu, należąca do rodziny *Micrococcaceae*.

Po raz pierwszy BKD zdiagnozowano w Norwegii w 1980 r. i od tego czasu rozprzestrzeniła się ona prawie na całym świecie. Od 1987 roku notuje się ją również w Polsce (2, 9). Ta jednostka chorobowa znajduje się na liście B Kodeksu Zoosanitarnego OIE, w Dyrektywie 91/67 EEC umieszczono ją na liście III. W polskim prawodawstwie podlega ona obowiązkowi rejestracji.

Tradycyjna metoda hodowli bakterii *in vitro* jest trudna i czasochłonna. Wzrost tych drobnoustrojów trwa od 3 do 7 tygodni, a ponadto jest często zagłuszany przez rozwój innych bakterii lub grzybów. Dlatego też do wykrywania *R. salmoninarum* powszechnie stosowane są różne metody immunodiagnostyczne w tym testy ELISA. Technika ELISA polecana jest przez OIE (11) jako jedna z podstawowych metod szybkiej diagnostyki *R. salmoninarum*. Najczęściej stosowane są testy ELISA wykorzystujące królicze lub kozie przeciwciała poliklonalne przeciwko całemu komórkom

R. salmoninarum. Przy użyciu takich przeciwciał notowano występowanie reakcji fałszywie dodatnich (4, 5), jednak cechują się one większą czułością niż testy ELISA wykorzystujące przeciwciała monoklonalne (3, 8).

Celem badań była standaryzacja parametrów reakcji w teście ELISA wykorzystującym królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko całemu komórkom *R. salmoninarum* oraz ocena wartości diagnostycznej testu w wykrywaniu patogenu w narządach wewnętrznych ryb łososiowatych.

Materiał i metody

Przygotowanie surowicy odpornościowej i izolacja przeciwciał. Surowicę odpornościową przygotowano według schematu opisanego w OIE (11). Do immunizacji królików użyto całych komórek *R. salmoninarum* o mianie 10^9 komórek bakterii/ml inaktywowanych poprzez ogrzewanie w temp. 95°C przez 1 godz. Królikom podawano domięśniowo 4 dawki antygeny z adjuwantem Freuda w stosunku 1 : 1 w odstępach trzytygodniowych. Z pozyskanej surowicy izolowano przeciwciała przy użyciu siarczanu sodowego wg procedury opisanej przez Adams (1). Odsalanie surowicy przeprowadzano na kolumnie sefadeksowej G-25 (SIGMA) wg procedury producenta.

Przygotowanie koniugatu. Koniugację swoistych przeciwciał poliklonalnych z peroksydazą chrzanową (HRP)

przeprowadzono wg procedury Wilsona i Nakane 1978 opisanej przez Adams (1). Poprawność koniugacji sprawdzano określając współczynnik koniugacji będący ilorazem z otrzymanych wartości OD roztworu przy długości fali 403 i 280 nm.

Kontrole dodatnie i ujemne. Kontrole dodatnie stanowiły homogenaty nerki pstrągów tęczy pochodzących z obiektów wolnych od BKD, zakażone referencyjnym szczepem *R. salmoninarum* NCIMB1112. Bakterie zawieszano w PBS z dodatkiem 0,01% Thimerosalu i 0,05% Tween 20 (PBS-T20), wyjściowe stężenie ustalono na 10^9 komórek/ml. Homogenaty nerek inokulowano przygotowanymi rozcieńczeniami bakterii (1 : 10, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 5000, 1 : 10 000, 1 : 50 000) w stosunku 1 : 4. Próbkę ogrzewano w temp. 100°C przez 15 min. i wirowano przez 10 min. przy $3000 \times g$. Do badań użyto supernatantu. Kontrole ujemne stanowiły próbki nerki karpia, które rozcieńczano w PBS-T20 w stosunku 1 : 4, homogenizowano, a następnie ogrzewano i wirowano analogicznie jak próbki dodatnie. Jako próbki ślepej użyto PBS z dodatkiem 1% albuminy wołowej (BSA) i 0,01% Thimerosalu (PBS-BSA).

Przygotowanie próbek terenowych. Próbkę do badań pobierano bezpośrednio po uśmierceniu pstrągów. Materiał stanowiły aseptycznie pobrane nerki z części głowowej, zawieszono w PBS-T20 w stosunku 1 : 4. Próbkę homogenizowano, ogrzewano przez 15 min. w temp. 100°C, a następnie wirowano przez 10 min. przy $3000 \times g$. Do badań używano supernatantu.

Wykonanie testu ELISA. Procedura przeprowadzenia testu została zaczerpnięta z opracowania Adams (1), przy czym wprowadzono własne modyfikacje w zakresie czasu oraz temperatury opłaszczania płytek przeciwciałami, czasu i temperatury inkubacji antygeny, doboru odpowiedniego stężenia koniugatu. Po ustaleniu optymalnych warunków reakcji test wykonano według następującego protokołu. Do 96-dołkowych okrągłodennych płytek Maxi Sorp firmy Nunc nanoszono po 100 μ l roztworu swoistych przeciwciał w stężeniu 10 μ g/ml zawieszonych w buforze węglanowym pH 9,6. Płytkę inkubowano przez 2 godz. w temp. pokojowej, a następnie 24 godz. w 4°C. Po inkubacji dołki przemywano trzykrotnie niskosolnym buforem płuczającym (na 1000 ml wody redestylowanej: 2,42 g 0,02 M Trizma; 22,2 g 0,38 M NaCl; 0,01% Thimerosal; 0,05% Tween 20; pH w 7,4 w 4°C), blokowano 1% roztworem albuminy w PBS z dodatkiem 0,01% Thimerosalu, inkubowano w temp. pokojowej przez 30 min. i powtórnie płukano. Tak przygotowane płytki przetrzymywano w 4°C aż do użycia. Każdą badaną próbkę oraz próbki kontrolne nanoszono do 2 dołków w płytce w ilości po 100 μ l do każdego dołka. Płytkę inkubowano w cieplarni z kołyską w temp. pokojowej przez 2 godz. przy 75 obrotach/min., przemywano pięciokrotnie wysokosolnym buforem płuczającym (na 1000 ml wody redestylowanej: 2,42 g 0,02 M Trizma; 29,2 g 0,5 M NaCl; 0,01% Thimerosal; 0,01% Tween 20; pH w 7,4 w 4°C). Następnie nanoszono po 100 μ l przeciwciał skoniugowanych z HRP rozcieńczonych w PBS-BSA w stosunku 1 : 2000, inkubowano 1 godz. w temp. pokojowej, przepłukiwano pięciokrotnie wysokosolnym buforem płuczającym, po czym dodawano 100 μ l substratu 3,3',5,5'-te-

tramethyl-benzidine (TMB) (SIGMA). Po półgodzinnej inkubacji dołki blokowano 2 M H_2SO_4 i odczytywano wartość OD przy długości fali 450 nm.

W każdej serii badań wyliczono także procentowy współczynnik zmienności według wzoru (1):

$$\%wz = \left[\frac{\text{odchylenie standardowe (OS)}}{\text{średnia absorbancji}} \right] \times 100\%$$

Ocena testu. Ocena przeprowadzono przy użyciu 130 próbek dodatnich i ujemnych. Określano następujące parametry: wyznaczenie wartości progowej dla wyników dodatnich i ujemnych, czułość analityczną, selektywności testu oraz dokładności, czułości i specyficzności diagnostycznej. Każdy z parametrów wyliczany był na podstawie wyników uzyskanych przynajmniej w 7-krotnych powtórzeniach.

Wartość progową wyznaczano na podstawie analizy wartości OD uzyskanych z prób ujemnych i prób ślepych wzbogaconych antygenami *R. salmoninarum* na poziomie granicy wykrywalności (5×10^4 komórek/ml). Analizę statystyczną przeprowadzono według schematu Bernoulliego. Czułość analityczną określano wyznaczając najniższe stężenie antygeny, które można wykryć w próbce. Do tego celu użyto próbek zawierających różne stężenia antygeny *R. salmoninarum* w zakresie 10^3 - 10^7 komórek bakterii/ml. Badanie przeprowadzono w 7 powtórzeniach. Wyniki wyrażono jako przedział, w którym zawarty jest poziom odpowiadający częstości wykrycia równej 50% (7). Selektywność testu określano badając możliwość wystąpienia ewentualnych reakcji krzyżowych z izolatami bakterii wyosobnionymi od ryb łososiowatych: *Acinetobacter* sp., *Aeromonas bestiarum*, *A. veroni* bt *sobria*, *Corynebacterium* sp., *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fluorescens* *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Schewanella putrefaciens*, *Yersinia ruckeri*. Dokładność, czułość i selektywność diagnostyczną testu wyznaczano według procedury opisanej w normie ISO/FDIS 16140:2002 (E) (7).

Ocena przydatności testu do wykrywania *R. salmoninarum* w próbkach terenowych. Ogółem przebadano 60 próbek z narządów wewnętrznych pstrągów pochodzących z 25 obiektów hodowlanych. Tylko 4 próbki z 2 obiektów pochodziły od ryb wykazujących objawy BKD. Te same próbki badano równocześnie przy użyciu komercyjnego testu ELISA K-Dtect (DiagXotics Inc., USA) opartego na przeciwciałach monoklonalnych, a także metody hodowlanej, posiewając materiał na podłoże SKDM.

Wyniki i omówienie

Przed przystąpieniem do określenia optymalnych warunków reakcji testu, sprawdzono poprawność koniugacji przeciwciał z HRP. Wyliczony współczynnik wynosił 0,38, a więc znajdował się w przedziale wyznaczającym poprawność koniugacji (0,3-0,6) (1).

W poszczególnych seriach badań przeprowadzonych w ustalonych warunkach, współczynnik zmienności w odniesieniu do określonych wzorców wahał się w zakresie 4,5-8,6%. Ogólnie uważa się za akceptowalne wartości do 10% (1).

Tab. 1. Wyniki uzyskane w 7 powtórzeniach badań przy wartości progowej ustalonej na poziomie 3S od średniej wartości prób ślepych ($X_{BL} + 3S_{BL}$)

$X_{BL} + 3S_{BL}$ w kolejnych seriach	Próbki ujemne			Próbki ślepe wzbogacone		
	liczba badanych	wynik dodatni	wynik ujemny	liczba badanych	wynik dodatni	wynik ujemny
0,065	27	0	27			
0,082				4	3	1
0,063	16	2	14			
0,056	6	0	6	2	2	0
0,090	6	1	5	4	4	0
0,081	4	0	4	2	1	1
0,105				6	6	0
0,072	24	0	24	4	4	0
0,120	8	1	7	4	3	1
Ogółem	91	3	88	22	19	3

Tab. 2. Wyniki badania różnych stężeń antygeny w próbkach

Liczba komórek (Rs/ml)	Liczba wyników dodatnich*	Liczba wyników ujemnych*	Częstości wykrycia
10^3	0	20	0/20 = 0%
10^4	5	15	5/20 = 25%
5×10^4	23	3	23/26 = 88%
10^5	33	1	33/34 = 97%
10^6	34	0	34/34 = 100%
10^7	28	0	28/28 = 100%

Objaśnienie: *wartości OD dla wyników dodatnich lub ujemnych były odpowiednio wyższe lub niższe od wartości progowej: $X_{BL} + 3S_{BL}$ w poszczególnych seriach badań

Ocenę testu przeprowadzono przy optymalnych warunkach reakcji. Wyniki uzyskane w 7 seriach badań próbek ujemnych oraz próbek ślepych wzbogaconych domieszką *R. salmoninarum* w stężeniu 5×10^4 (stężenie na poziomie granicy wykrywalności) pozwoliły na wstępne ustalenie wartości progowej na poziomie $X_{BL} + 3S_{BL}$ (X_{BL} – wartość średnia prób ślepych; S_{BL} – odchylenie standardowe prób ślepych). Próbkę wykazujące OD wyższe od tej wartości były oceniane jako dodatnie (tab. 1). Ze względu na znaczne różnice wartości OD (> 10%) prób ślepych uzyskiwanych w różnych seriach badań konieczne jest wyliczenie wartości progowej każdorazowo przy wykonywaniu testu. Analiza statystyczna wykazała, że uzyskane wyniki w poszczególnych rodzajach prób mieszczą się w granicach 95% przedziału ufności.

Według Bandin i wsp. (4), czułość analityczna testów ELISA jest zbyt niska do monitorowania nosicielstwa *R. salmoninarum*. Autorzy ci wykrywali obecność *R. salmoninarum* w próbkach zawierających powyżej 10^6 komórek/g tkanki. W badaniach własnych najniższy poziom wykrywalności mieścił się w granicach 10^4 - 5×10^4 komórek/ml. W próbkach zawierają-

cych takie stężenia antygeny wyniki dodatnie uzyskiwano odpowiednio z 25% i 88% częstością (tab. 2). Podobne wyniki przedstawiły inne zespoły badawcze (8, 10).

Znane są sporadyczne przypadki występowania reakcji krzyżowych w teście ELISA z bakteriami innymi niż *R. salmoninarum*, między innymi z *Carnobacterium piscicola* i *Xanthomonas maltophilia* (4). W badaniach własnych nie wykazano reakcji krzyżowych z żadnym z 13 testowanych izolatów bakteryjnych. W próbkach ślepych inokulowanych testowanymi izolatami średnie wartości OD były niższe od wartości progowej (tab. 3). Te same izolaty dodane w stężeniu 10^6 do prób dodatnich zawierających antygen *R. salmoninarum* nie zakłócały w istotny sposób wyników reakcji. W przypadku prób zakażonych bakteriami *H. alvei*, *E. tarda*, *Streptococcus* sp. i *Corynebacterium* sp. wartości OD były od 15-22% wyższe niż

Tab. 3. Wyniki uzyskane w próbach ślepych zakażonych izolatami różnych bakterii w stężeniu 10^7 i 10^4 komórek/ml

Testowane bakterie	Stężenie	Wartości OD (średnie z 2 oznaczeń)	Wynik (przy wartości progowej 0,065)
<i>Acinetobacter</i> sp.	10^7	0,060	-
	10^4	0,056	-
<i>Aeromonas bestiarum</i>	10^7	0,062	-
	10^4	0,061	-
<i>A. veroni</i> bt <i>sobria</i>	10^7	0,060	-
	10^4	0,057	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	10^7	0,052	-
	10^4	0,057	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	10^7	0,055	-
	10^4	0,057	-
<i>Flavobacterium columnare</i>	10^7	0,061	-
	10^4	0,062	-
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	10^7	0,051	-
	10^4	0,054	-
<i>Halnia alvei</i>	10^7	0,057	-
	10^4	0,057	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10^7	0,056	-
	10^4	0,060	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	10^7	0,057	-
	10^4	0,054	-
<i>Streptococcus</i> sp.	10^7	0,050	-
	10^4	0,053	-
<i>Schewanella putrefaciens</i>	10^7	0,062	-
	10^4	0,061	-
<i>Yersinia ruckeri</i>	10^7	0,055	-
	10^4	0,056	-
Próba ślepa	-	0,053	-

Tab. 4. Wyniki uzyskane w próbach dodatnich zakażonych izolatami różnych bakterii

Czynnik zakaźający	OD (średnia z 2 oznaczeń)	Wynik
<i>Yersinia ruckeri</i>	2,358	+
<i>Aeromonas bestiarum</i>	2,596	+
<i>A. veroni</i> bt <i>sobria</i>	2,442	+
<i>Hafnia alvei</i>	2,647	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	2,663	+
<i>Schewanella putrefaciens</i>	2,594	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,441	+
<i>Renibacterium salmoninarum</i> (10 ⁷ komórek ml ⁻¹)	2,477	+
<i>Flavobacterium columnare</i>	2,156	+
<i>Flavob. psychrophilum</i>	2,156	+
<i>Acinetobacter</i>	2,095	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	1,941	+
<i>Streptococcus</i> sp.	2,619	+
<i>Corynebacterium</i> sp.	2,547	+
<i>R. salmoninarum</i> (10 ⁶ komórek ml ⁻¹)	2,0142	+

Tab. 5. Porównanie wyników uzyskanych przy użyciu opracowanego testu ELISA, K-Dtect ELISA (monoklonalny) i metodzie hodowlanej

Hodowla Rs na SKDM			Własny test ELISA		K-Dtect ELISA	
+	-	Wynik nieczytelny	+	-	+	-
14	35	11	19	41	17	43

w próbkach nie zawierających obcych bakterii, jednak nie miało to wpływu na ostateczną ocenę wyników jako dodatnie (tab. 4).

Na podstawie analizy wyników uzyskanych ze 130 próbek dodatnich i ujemnych wykazano, że metoda cechuje się dokładnością na poziomie 96%, specyficznością diagnostyczną na poziomie 97% i czułością diagnostyczną na poziomie 96%. Analiza statystyczna wykazała, że każdy z tych parametrów jest akceptowalny na poziomie $p \leq 0,05$.

Wyniki badań próbek terenowych przedstawiono w tab. 5. Z przebadanych 60 próbek w 19 uzyskano wynik dodatni przy użyciu własnego testu ELISA. W teście K-Dtect wynik dodatni wykazywało 17 próbek. Wyniki uzyskane metodą hodowli na SKDM można było ocenić tylko w przypadku 49 próbek. W pozostałych 11 były one nieczytelne ze względu na przerost podłoża bakteriami lub grzybami szybko rosnącymi. Wyniki obu testów ELISA były zgodne w 95% (57 próbek). Zgodność własnego testu ELISA i metody hodowli na SKDM porównywana dla 49 próbek wynosiła 96% (47 próbek). Świadczy to o nieco wyższej czułości opracowanego testu ELISA w porównaniu z testem K-Dtect.

Wyniki badań wskazują na dużą przydatność opracowanego testu w diagnostyce BDK jak też do wykrywania *R. salmoninarum* w narządach wewnętrznych u bezobjawowych nosicieli. Dalsze badania skierowane będą na podniesienie czułości analitycznej testu oraz ocenę jego przydatności do wykrywania *R. salmoninarum* w ziarnach ikry i płynie jajnikowym.

Piśmiennictwo

- Adams A.: Techniques in fish immunology. SOS Publications, New Jersey 1992, 177-184.
- Antychowicz J., Grawiński E.: Bakteryjna choroba nerek u ryb lososiowatych. Życie Wet. 1994, 69, 209-212.
- Austin B., Austin D. A.: Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, Springer Praxis Publishing, London 1999, 166-173.
- Bandin L., Heinen P., Brown L. L., Toranzo A. E.: Comparison of different ELISA kits for detecting *Renibacterium salmoninarum*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1996, 16, 19-22.
- Brown L. L., Evelyn T. P. T., Iwama G. K., Nelson W. S., Levine R. P.: Bacterial species other than *Renibacterium salmoninarum* cross-react with antiserum against *R. salmoninarum* but are negative for the p57 gene of *R. salmoninarum* as detected by the polymerase chain reaction (PCR). Dis. Aquat. Org. 1995, 21, 227-231.
- Fryer J. L., Lannan C. N.: Bacterial kidney disease of salmonid fish. Ann. Rev. Microbiol. 1981, 35, 273-298.
- ISO/FDIS 16140:2002 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for validation of alternative methods. Geneva 2002.
- Jansson E., Torbjörn H., Höglund J., Ljungberg O.: Comparative evaluation of bacterial culture and two ELISA techniques for the detection of *Renibacterium salmoninarum* antigens in salmonid kidney tissues. Dis. Aquat. Org. 1996, 27, 197-206.
- Kozińska A., Mazur W., Paszowska K.: Przypadki bakteryjnej choroby nerek u pstrąga źródłanego. Medycyna Wet. 2001, 57, 273-275.
- Meyers T. R., Short S., Farrington C., Lipson K., Geiger H. J., Gates R.: Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the fluorescent antibody test (FAT) for measuring the prevalences and levels of *Renibacterium salmoninarum* in wild and hatchery stocks of salmonid fishes in Alaska, USA. Dis. Aquat. Org. 1993, 16, 181-189.
- OIE Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Fourth Edition, Office International Des Epizooties, Paris 2003, s. 71-72, 167-184.

Adres autora: dr Alicja Kozińska, ul. Kusocińskiego 1/25, 24-100 Puławy; e-mail: koala@piwet.pulawy.pl

PICARD-MEYER E., BARRAT J., TISSOT E., BARRAT M. J., BRUYÈRE V., CLIQUET F.: Genetyczna analiza izolatów europejskiego wirusa wścieklizny nietoperzy typ 1 pochodzących z Francji. (Genetic analysis of European bat lyssavirus type 1 isolates from France). Vet. Rec. 154, 589-598, 2004 (19)

Znanych jest 7 genotypów wirusa wścieklizny (*Lyssavirus*; *Rhabdoviridae*), a mianowicie: genotyp 1 (klasyczny wirus wścieklizny), genotyp 2 (wirus wścieklizny nietoperzy Lagos – LBV), genotyp 3 (Mokola), genotyp 4 (Duvenhage), genotyp 5 (europejski lyssavirus nietoperzy typ 1; EBLV-1), genotyp 6 (europejski lyssavirus nietoperzy typ 2; EBLV-2), genotyp 7 (australijski lyssavirus nietoperzy – ABLV). W sierpniu 2002 r. wyizolowano po raz pierwszy od nietoperza (*Eptesicus serotinus*) EBLV-1a. Wściekliznę rozpoznano stosując metody diagnostyki molekularnej, a do badań porównawczych wirus wścieklizny izolowany od lisów (genotyp 1), dwa szczepy ustalone wirusa wścieklizny (CVS-27 i CVS-11), jeden izolat wirusa wścieklizny genotyp 2, ABLV, jeden izolat EBLV-1a-Duv07 i 14 EBLV-1. Analiza filogenetyczna z użyciem 14 izolatów EBLV-1 wykazała zróżnicowane rozmieszczenie EBLV-1a i EBLV-1b wśród nietoperzy na terenie Francji.