

· 研究简报 ·

迟缓爱德华氏菌间接 ELISA 快速检测法

白方方, 兰建新, 王燕, 韩茵, 张晓华

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 以迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) WY28 作为抗原, 免疫新西兰兔, 获得效价为 1:2 048 的多克隆抗体; 以此多克隆抗体作为一抗, 山羊抗兔 IgG-HRP 作为酶标二抗, 建立迟缓爱德华氏菌的间接 ELISA 快速检测法。采用棋盘滴定法确定抗原与一抗的最佳工作浓度分别为 10^6 CFU·mL⁻¹ 和 1:10 000; 酶标二抗的最适工作浓度为 1:1 000。病原菌检测灵敏度为每孔 10^3 CFU。该方法标准化后具有快速、灵敏等特性, 与肠杆菌科其他细菌参考菌株无交叉反应, 具有良好的特异性。对养殖场发病大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 和半滑舌鳎中分离的细菌菌株进行检测, 从 56 株分离菌株中检测出 27 株迟缓爱德华氏菌, 阳性检出率为 48.2%。该方法的建立有助于快速准确地诊断由迟缓爱德华氏菌引起的养殖鱼类病害。[中国水产科学, 2009, 16(4): 619-625]

关键词: 间接 ELISA; 迟缓爱德华氏菌; 多克隆抗体; 水产养殖; 病原菌

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)04-0619-07

迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 是中国水产养殖中具有极大危害的病原菌^[1-3]。在鱼类中, 迟缓爱德华氏菌的宿主范围广, 能够感染多种淡水和海水鱼类, 包括大菱鲂 (*Scophthalmus maximus* L.)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、鳎 (*Anguilla japonica*)、真鲷 (*Pagrus major*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鲮鱼 (*Mugil cephalus*) 和罗非鱼 (*Aequidens maronii*) 等, 其感染造成鱼类出血性败血症以及内脏组织的坏死等病症, 统称为爱德华氏菌病 (edwardsiellosis), 最终导致患鱼死亡^[4]。另外, 迟缓爱德华氏菌还可感染鸟类、哺乳动物及爬行动物等。更为重要的是, 迟缓爱德华氏菌还是一种重要的人畜共患病的病原菌, 也是爱德华氏菌属中唯一感染人类的种类, 能够造成人类胃肠道感染, 还能引起败血症、菌血症、脓毒性关节炎和肌肉坏死等病症^[4]。

近几年来, 迟缓爱德华氏菌继鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 后给中国海水养殖业造成了巨大的经济

损失。目前对迟缓爱德华氏菌的检测方法仍然以常规的分离培养、生理生化鉴定及 16S rDNA 测序为主。常规方法具有检测时间长、敏感性低的不足, 而酶联免疫吸附法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 具有特异性强、敏感性高、检测时间短等优点。本研究旨在建立快速检测迟缓爱德华氏菌的间接 ELISA 技术, 为今后快速检测海水养殖鱼类及养殖环境中迟缓爱德华氏菌提供理论依据, 也为迟缓爱德华氏菌的 ELISA 快速检测试剂盒的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

迟缓爱德华氏菌 WY28 由本实验室于 2006 年 9 月分离自山东胶南某养殖场发病大菱鲂, 本实验室鉴定; 迟缓爱德华氏菌参考菌株 NCIMB 2034 购自英国食品工业与海洋细菌菌种保藏中心 (NCIMB); 猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*) 1.1859、阴沟

收稿日期: 2008-10-30; 修订日期: 2009-01-22.

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2007AA09Z434); 农业部公益性行业科研专项资助 (nyhyzx07-046).

作者简介: 白方方 (1982-), 女, 博士研究生, 研究方向: 海洋微生物学

通讯作者: 张晓华, 博士, 教授, 从事海洋微生物学和海水养殖动物病害研究. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 1.2022、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 1.1734、黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 1.2818 及类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 1.1998 等肠杆菌科参考菌株购自中国科学院微生物研究所; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 由本实验室保存; 新西兰大白兔购于青岛市实验动物中心; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自武汉博士德公司。

1.2 迟缓爱德华氏菌的制备和灭活

以平板划线法将迟缓爱德华氏菌接种于含有 1.5% NaCl 的 LB (LBN) 培养基上, 28 °C 培养; 24 h 后挑取单菌落接种于 LBN 液体培养基中, 160 r·min⁻¹ 振荡、过夜培养; 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清; 加入 1% 的甲醛于 37 °C 灭活 24 h, 通过菌落涂布法检测灭活效果; 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 用 McFarland 比浊法, 配制出浓度约为 1×10^8 cells·mL⁻¹ 的菌悬液作为免疫抗原。

1.3 免疫血清的制备

选择 2 只体质量为 2 kg 左右的健康新西兰雄兔, 背部皮下多点注射免疫, 分 5 次免疫, 第二次免疫和第一次免疫的间隔期为 2 周, 此后每周加强免疫一次。于最后一次免疫 7 d 后, 耳静脉采血, 分离血清, 用微孔板凝集法测定抗体效价及交叉反应效价, 效价达到 1:2 048 以上即可使用。心脏采血, 37 °C 放置 1 h, 然后 4 °C 放置过夜, 低速离心收集血清, 分装于冷冻管中, -80 °C 冰箱冷藏备用^[5]。在第一次免疫试验前, 从兔耳静脉采血, 分离血清, 此为阴性血清。

1.4 ELISA 方法的建立

1.4.1 ELISA 检测流程 用 pH 9.6 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液稀释迟缓爱德华氏菌抗原, 加入 96 孔聚苯乙烯酶标反应板孔内, 每孔 100 μL, 60 °C 烘干, 用 PBST (PBS+0.2% Tween 20) 缓冲液洗涤 3 次; 每孔加入 300 μL 3% 脱脂奶粉-PBS 封闭液, 37 °C 封闭 1 h, PBST 缓冲液洗涤 3 次; 每孔加入 100 μL 适当稀释的阳性血清和阴性血清, 37 °C 反应 1 h, PBST 缓冲液洗涤 3 次; 每孔加入 100 μL 的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体, 37 °C 反应 1 h; PBST 缓冲液洗涤 3 次; 加新配制的

OPD-H₂O₂ 底物溶液, 每孔 100 μL, 37 °C 避光反应 10 min; 以 50 μL 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应; 用酶标检测仪读取 OD₄₉₂ 值, 以判定结果^[6]。

1.4.2 用棋盘式滴定法确定抗原最适包被浓度 将 10⁸ CFU·mL⁻¹ 浓度的迟缓爱德华氏菌用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 从 1:10 至 1:10 000 做系列稀释, 每个稀释度包被 2 孔, 每孔 100 μL, 60 °C 烘干。固定阳性血清浓度 (1:2 000), 酶标抗体作 1:1 000 稀释, 进行间接 ELISA 测定。以能产生 OD₄₉₂ 值为 1.0 左右, 且 P/N 值 (阳性对照 OD₄₉₂ 值-空白对照 OD₄₉₂ 值/阴性对照 OD₄₉₂ 值-空白对照 OD₄₉₂ 值) 最大的抗原稀释度为最佳稀释度^[5,7]。

1.4.3 免疫血清最适稀释度的确定 迟缓爱德华氏菌抗原按最适工作浓度包被, 将阳性血清和阴性血清分别按 1:5 000、1:10 000、1:15 000、1:20 000、1:25 000、1:30 000 进行系列稀释, 每孔 100 μL, 每个稀释度 2 孔; 酶标抗体作 1:1 000 稀释, 用间接 ELISA 方法测定。选择阳性血清的 OD₄₉₂ 值接近 1.0, P/N 值最大的稀释度为最适稀释度。

1.4.4 免疫血清敏感性实验 将迟缓爱德华氏菌悬液稀释成 10⁶ CFU·mL⁻¹, 而后进行十倍比稀释至 2⁻¹⁰, 将血清稀释到最适工作浓度, 以确定最小的抗原检测浓度。以产生 OD₄₉₂ 值接近 1.0, P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性^[7]。

1.4.5 特异性实验 用浓度均为 10⁶ CFU·mL⁻¹ 的迟缓爱德华氏菌、大肠杆菌、猪霍乱沙门氏菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、黏质沙雷氏菌和类志贺邻单胞菌包被酶标反应板, 血清采用最适稀释度, 检测是否有交叉反应^[8]。

1.5 海水养殖鱼中迟缓爱德华氏菌的检测

2006 年夏季以来, 山东省即墨、胶南和昌邑及江苏连云港一带的许多海水养殖场半滑舌鳎和大菱鲆经常发生暴发性传染病。从这些病鱼中分离到一批病原菌, 接种到 LBN 斜面上, 培养 22 h, 用无菌生理盐水洗下, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 加入 1% 的甲醛固定过夜, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 用 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.6) 缓冲液将稀释至 10⁶ CFU·mL⁻¹ 作为待检测的包被抗原。用建立的间接 ELISA 的方法对

病原菌进行检测。每个抗原稀释度做2个平行,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 迟缓爱德华氏菌的免疫血清制备

用家兔制备迟缓爱德华氏菌的免疫血清,以微孔板凝集法测定抗血清的效价,发现迟缓爱德华氏菌有很好的免疫原性,免疫5次后2只兔子的抗体效

价均可达1:2 048以上,可以此抗血清作为ELISA检测用的一抗。

2.2 ELISA检测方法的标准化

2.2.1 抗原最适包被浓度的确定 对抗原作不同稀释度处理所测得的阳性血清和阴性血清的OD₄₉₂值如表1所示,由于抗原在作1:100稀释时OD₄₉₂值接近1.0,且P/N值最大,所以确定抗原的最适包被浓度为10⁶ CFU·mL⁻¹。

表1 抗原最适包被浓度的确定
Tab. 1 Determination of optimum antigen concentration

血清 Serum	抗原稀释度 Antigen concentration				对照 Control
	1:10	1:100	1:1000	1:10000	
阳性血清 OD ₄₉₂ Positive serum OD ₄₉₂	3.119	1.361	0.869	0.346	0.022
阴性血清 OD ₄₉₂ Negative serum OD ₄₉₂	0.145	0.134	0.132	0.133	0.021

2.2.2 免疫血清最适稀释度的确定 不同稀释度的血清测定结果见表2。当免疫血清作1:10 000稀释

时, OD₄₉₂值接近1.0,且产生最大P/N值,因此检测用免疫血清的最适稀释度确定为1:10 000。

表2 血清最适工作浓度的确定
Tab. 2 Determination of optimum antiserum concentration

血清 Serum	抗原稀释度 Antigen concentration						对照 Control
	1:5000	1:10000	1:15000	1:20000	1:25000	1:30000	
阳性血清 OD ₄₉₂ Positive serum OD ₄₉₂	2.407	1.403	0.767	0.441	0.385	0.313	0.023
阴性血清 OD ₄₉₂ Negative serum OD ₄₉₂	0.142	0.136	0.131	0.128	0.125	0.123	0.021

2.2.3 免疫血清敏感性实验 用最适稀释度的血清(1:10 000 V/V)检测抗原的灵敏度,结果见表3。

测定结果菌悬液为10⁴ CFU·mL⁻¹时即可检出,即每孔10³ CFU。

表3 免疫血清敏感性实验结果
Tab. 3 Result of antiserum sensitivity

抗原稀释度 Antigen concentration	OD ₄₉₂	P/N	-/+
2-1	2.289	20.24	+
2-2	1.357	11.92	+
2-3	1.167	10.22	+
2-4	0.948	8.26	+
2-5	0.503	4.29	+
2-6	0.304	2.52	+
2-7	0.252	2.05	-
2-8	0.225	1.81	-
2-9	0.165	1.28	-
2-10	0.154	1.18	-
阴性对照 Negative control	0.134		
空白对照 Blank control	0.022		

2.2.4 交叉实验 检测大肠杆菌、志贺氏菌、沙门氏菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、黏质沙雷菌和类志贺邻单胞菌与兔抗迟缓爱德华氏菌血清交叉反应

情况,迟缓爱德华氏菌作对照,结果显示只有迟缓爱德华氏菌呈阳性,其余细菌均呈阴性(表4)。

表4 免疫血清交叉试验结果
Tab. 4 Result of antiserum cross reaction

血清 Serum	抗原 Antigen							空白对照 Blank control
	迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	猪霍乱沙门氏菌 <i>S. choleraesuis</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	肺炎克雷伯氏菌 <i>K. pneumonia</i>	黏质沙雷氏菌 <i>Serr. arcescens</i>	类志贺邻单胞菌 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	
阳性血清 OD ₄₉₂	1.388	0.231	0.265	0.217	0.253	0.238	0.267	0.022
阴性血清 OD ₄₉₂	0.136	0.127	0.141	0.134	0.142	0.143	0.145	0.022
交叉反应 Cross reaction	+	-	-	-	-	-	-	-

2.3 海水养殖鱼中迟缓爱德华氏菌的检测

对从多个海水养殖场半滑舌鳎和大菱鲆中分离的病原菌进行间接ELISA检测,从56株致病菌中检出27株迟缓爱德华氏菌,阳性检出率为48.2%(表5)。其中从山东胶南和江苏连云港一带发病大菱鲆中分离出的26个菌株(WY17—WY44)全部为迟缓爱德华氏菌阳性;从山东昌邑一带发病大菱鲆中分离出的17个菌株(LTB3—LTS2)中,仅有1株(LTB4)为迟缓爱德华氏菌阳性;而从山东即墨一带发病的半滑舌鳎中分离出的13个菌株(WY01—WY16)均为迟缓爱德华氏菌阴性。

3 讨论

爱德华氏菌病是由迟缓爱德华氏菌引起的,能够感染包括海水鱼和淡水鱼的多种鱼类^[9]。爱德华氏菌病的前期往往只有少数鱼死亡,一段时间后才会大规模发病^[10],因此迟缓爱德华氏菌的快速检测技术对于控制爱德华氏菌病非常关键。传统上鱼类细菌病的诊断,主要对细菌生理生化特征等进行分析,费时长、工作量大,给鱼病的及时治疗、流行病的控制以及流行病学调查带来了极大的困难。PCR技术能够比较迅速地检测特定的病原菌,具有灵敏度高、特异性强等特点,但存在较高费用和实验条件不足等

问题。间接ELISA技术应用于其他水产病害方面的报道很多,国内外学者已对柱状嗜纤维菌^[11]、嗜水气单胞菌^[12-13]、鳃弧菌^[14]、溶藻弧菌和副溶血弧菌^[6,15]等水产养殖重要致病菌建立了行之有效的快速检测手段,但是用于检测迟缓爱德华氏菌的有效方法在国内尚属首次报道。本研究制备的迟缓爱德华氏菌多克隆抗体具有很强的特异性,它与肠杆菌科的多个参考菌株均无交叉反应,以此抗体建立的间接ELISA可用于迟缓爱德华氏菌的检测,最低检出阈值为 10^4 CFU·mL⁻¹。

用建立的间接ELISA检测方法对海水养殖鱼中分离的病原菌进行检测,从56株致病菌中检测出27株迟缓爱德华氏菌,阳性检出率为48.2%。检出率存在较大的地域差异和鱼种差异,山东胶南和江苏连云港一带发病大菱鲆迟缓爱德华氏菌检出率达100%,山东昌邑发病大菱鲆仅检出1株,而山东即墨一带发病半滑舌鳎中未能检出,先前的研究表明,该区域半滑舌鳎的流行病是由美人鱼发光杆菌杀鱼亚种引起^[16]。经间接ELISA检测为阳性的菌株中,WY37及LTB-4经16S rDNA序列测定与GenBank中的迟缓爱德华氏菌16S rDNA序列相似度为99.9%^[17],表明建立的间接ELISA方法可以快速准确的检测由

表5 间接ELISA法对海水养殖鱼分离菌株中迟缓爱德华氏菌的检测
 Tab. 5 Detection of *Edwardsiella tarda* on pathogen isolated from the infected fish

样品编号 Sample	OD ₄₉₂	结果 Result	样品编号 Sample	OD ₄₉₂	结果 Result
WY01	0.041	-	WY33	0.669	+
WY02	0.031	-	WY34	0.893	+
WY03	0.024	-	WY36	0.795	+
WY04	0.035	-	WY37	0.749	+
WY05	0.024	-	WY38	0.790	+
WY06	0.109	-	WY39	0.807	+
WY07	0.029	-	WY40	0.786	+
WY10	0.033	-	WY41	0.743	+
WY11	0.017	-	WY42	0.826	+
WY13	0.021	-	WY43	0.772	+
WY14	0.031	-	WY44	0.797	+
WY15	0.016	-	LTB3	0.027	-
WY16	0.023	-	LTB4	0.982	+
WY17	0.776	+	LTDW	0.017	-
WY18	0.663	+	LTK1	0.045	-
WY20	0.664	+	LTK11	0.022	-
WY21	0.626	+	LTK21	0.041	-
WY22	0.664	+	LTK31	0.052	-
WY23	0.691	+	LTK41	0.050	-
WY24	0.676	+	LTK61	0.033	-
WY25	0.649	+	LTKQ	0.129	-
WY26	0.727	+	LTM1	0.042	-
WY27	0.676	+	LTP3	0.021	-
WY28	0.667	+	LTP5	0.032	-
WY29	0.619	+	LTP6	0.020	-
WY30	0.671	+	LTQ1	0.015	-
WY31	0.691	+	LTQ5	0.097	-
WY32	0.644	+	LTS2	0.025	-

注: 均已扣除对照OD值。

Note: The control value of OD had been deducted.

迟缓爱德华氏菌引起的水产病害。

本研究所建立的迟缓爱德华氏菌间接ELISA具有快速、特异、准确度高等优点,为海水养殖鱼类及养殖环境中迟缓爱德华氏菌的检测提供快速准确的检测方法,并为迟缓爱德华氏菌的ELISA快速检测

试剂盒的研制提供科学依据,具有较大的实际意义。然而,该方法目前也存在一定的局限性,如制备检测试剂盒时待检样本标准化的问题以及检测到是迟缓爱德华氏菌后进而确定其是否为致病菌株等还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(1): 31-37.
- [2] 李筠, 颜显辉, 陈吉祥. 养殖大菱鲆腹水病病原的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 649-654.
- [3] 陈翠珍, 房海, 张晓君, 等. 牙鲆与大菱鲆病原迟钝爱德华氏菌生物学特性及系统发生学分析[J]. 高技术通讯, 2006, 15(10): 82-88.
- [4] Austin B, Austin D A. 2007. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish, 4th ed [M]. Chichester: Springer-Praxis.
- [5] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 84-89.
- [6] 王军, 鄢庆枇, 苏永全, 等. 养殖大黄鱼副溶血弧菌的酶联免疫吸附法研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(3): 346-350.
- [7] 窦勇, 宁喜斌. 副溶血弧菌间接ELISA快速检测法的建立[J]. 食品工业科技, 2007, 28: 205-209.
- [8] 张晓华, Peter Robertson, Brain Austin, 等. 检测海洋弧菌的酶联免疫吸附实验研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3): 326-331.
- [9] Plumb J A. *Edwardsiella septicaemias*. In fish diseases and disorders, viral, bacterial and fungal infections [M]. Woo P T K, Bruno, D W E (eds): CAB International, 1999: 479-521.
- [10] Ullah M A, Arai T. Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda* [J]. Fish Pathol, 1983, 18: 65-70.
- [11] 陈月英, 黄惟灏, 董济海. 用酶免疫测定法检测鱼害粘球菌的试验[J]. 水产学报, 1981, 5(1): 75-80.
- [12] 钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 应用酶联免疫吸附法检测爆发病原菌—嗜水气单胞菌的研究[J]. 水产养殖, 1993, (4): 14-17.
- [13] 林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗缩免疫球蛋白单抗的制备及特性[J]. 水产学报, 2001, 5(6): 532-537.
- [14] 邹玉霞, 莫照兰, 高光, 等. 间接ELISA技术在病原性鳃弧菌SMP1快速检测中的应用[J]. 海洋科学, 2007, 31(6): 75-78.
- [15] 鄢庆枇, 苏永全, 王军, 等. 用LPS抗血清进行溶藻弧菌间接ELISA检测[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32: 267-271.
- [16] Wang Y, Han Y, Li Y, et al. Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Gunther) in China [J]. ACTA Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 763-768.
- [17] Lan J, Zhang X H, Wang Y, et al. Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the *gyrB* gene [J]. J Appl Microbiol, 2008, 105(3): 644-651.

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid detection of *Edwardsiella tarda*

BAI Fang-fang, LAN Jian-xin, WANG Yan, HAN Yin, ZHANG Xiao-hua

(Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Bacterial strain WY28 was previously isolated from diseased turbot in September 2006, and was identified to be *Edwardsiella tarda*. The antisera against *E. tarda* WY28 were produced from two male New Zealand white rabbits and the titer of the polyclonal antibody was 1:2048. This polyclonal antibody was used in indirect ELISA as primary antibody, and the goat anti-rabbit IgG-HRP was used as secondary antibody. The indirect ELISA method of rapid detection of *E. tarda* was developed. The basic procedure of the indirect ELISA was as follows: *E. tarda* antigen was diluted with $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Carbonate buffer (pH 9.6) and $100 \mu\text{L}$ diluted antigen was added to each well of the 96 well plate, followed by drying out at $60 \text{ }^\circ\text{C}$. The plate was washed three times with PBST (PBS+0.2% Tween 20) buffer, and $300 \mu\text{L}$ of blocking buffer (3% skimmed dry milk in PBST) was added to each well and the plate was incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1h. Subsequently, the plate was washed three times with PBST buffer, and each well was added with diluted positive serum or negative serum before incubating the plate at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1h. Each well of the plate was added with goat anti-rabbit IgG-HRP after the plate was washed with PBST buffer three times. The plate was then incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1h, and was washed three times with PBST buffer. Each well was added $100 \mu\text{L}$ newly prepared substrate solution OPD- H_2O_2 after the plate was washed with PBST buffer three times. The reaction was terminated with $50 \mu\text{L}$ $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 after 10 min of reaction at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The value of OD_{492} was determined by the ELISA reader.

The optimum coated concentration of the antigen was determined to be $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ by using chessboard titration method. The optimum antiserum concentrations of the first antibody and the enzyme linked secondary antibody were determined to be 1:10 000 and 1:1 000, respectively. The sensitivity of the serum was tested, and the lowest concentration of *E. tarda* that can be detected was $10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cross reactions of the antiserum with the strains of other bacterial species in the family of Enterobacteriaceae were detected, and all the results were negative.

With the developed indirect ELISA method, pathogens isolated from the diseased turbot and tongue sole were detected. Twenty-seven out of 56 bacterial strains were positive, with a 48.2% positive detection rate. All the 26 bacterial strains isolated from infected turbot in the area of Jiaonan (Shandong Province) and Lianyungang (Jiangsu Province) were positive for *E. tarda*. Only 1 out of the 17 pathogens isolated from infected turbot in Changyi (Shandong) was positive. All the 13 pathogens isolated from diseased tongue sole in Jimo (Shandong) were negative for *E. tarda*. The results demonstrated that this assay can detect *E. tarda* with the bacterial concentration of $10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ within 6 h and the cross reactions with other bacterial species were negative. The established indirect ELISA technique is very important for rapid and accurate diagnosis of fish infected by *E. tarda*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (4): 619–625]

Key words: indirect ELISA; *Edwardsiella tarda*; polyclonal antibody; aquaculture; bacterial pathogen

Corresponding author: ZHANG Xiao-hua. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn