

Hoogtechnologische visdiagnostiek : de DNA Multiscan[®].

Auteur : Tim Barbé, Dierenarts/koidokter voor België en Zeeuws-Vlaanderen, tel. 0032-(0)477.64.06.74

Inleiding

Sinds september 2007 zijn Belgische onderzoekers onder leiding van Prof. Dr. Kris Willems en Dr. Ir. Bart Lievens druk in de weer geweest met het ontwikkelen van een nieuwe revolutie in de diagnose van bacteriële en virale visziekten : de DNA Multiscan[®]! Zoals de naam het al doet vermoeden kan met deze één enkele test een resem van ziekteverwekkers opgespoord worden en dan ook nog in een mum van tijd. Nu reeds in 2009 kan deze test ingezet worden in de praktijk en kunnen dierenartsen gebruik maken van het concept bij de diagnose van ziekten bij vissen.

Zieke tomaten

De ontwikkeling van de achterliggende technologie bestond reeds maar de echte basis voor dit specifieke visdiagnoseconcept komt verder uit het werk van Dr. Ir. Lievens die in zijn doctoraat een gelijkaardig project op punt stelde voor de detectie en kwantificatie van meer dan 50 ziekteverwekkers van planten (oa. schimmels bij tomaten).

Door een omschakeling van de te detecteren ziektekiemen werd nu de huidige test voor visziekten ontwikkeld die momenteel meer dan 20 soorten bacteriën en een vijftal soorten virussen op 36u tijd kan aantonen (zie lijsten). In de gehele ontwikkelingsfase van dit project hebben de meest vooraanstaande specialisten elk in hun domein op gebied van visziekten (wetenschappers uit diverse Europese landen, praktijkdierenartsen, enz..) hun medewerking verleend en aan de hand van meer dan 300 praktijkstalen is de test steeds verder geoptimaliseerd geweest naar het uiteindelijke resultaat dat nu in gebruik kan genomen worden.

Klassieke diagnose van visziekten

Vissen kunnen ziek worden door heel wat oorzaken, infectieuze en niet infectieuze. Infecties door parasieten of schimmels kunnen vaak onmiddellijk gediagnosticeerd worden maar infecties door bacteriën of virussen kunnen meestal maar vermoed worden na een degelijk klinisch onderzoek. De bevestiging en diagnose van het uiteindelijk oorzakelijk organisme (in dit geval dus de bacterie of het virus) gebeurt pas in een verdere stap in een gespecialiseerd laboratorium. Via het opkweken en allerhande (biochemische) testen tracht men aldaar de ziekteverwekker te benoemen.

In het beste geval weet men na 2 tot 3 dagen welke bacterie precies de vissen aantast maar er zijn veel soorten schadelijke bacteriën die niet of moeilijk kweekbaar zijn in het labo (bvb. *Mycobacterium*, de tuberculosebacil). Soms duurt het dagen of weken alvorens enige groei waarneembaar zal zijn of zijn er zeer specifieke voedingsbodems vereist wat het onderzoek langdurig, arbeidsintensief en niet altijd gevoelig of specifiek maakt. Sommige bacteriën zijn zelfs zo slim dat ze in een toestand kunnen komen waarin ze niet meer op te kweken zijn.

Dit maakt dat traditionele methoden wel eens te weinig doeltreffend en doelmatig kunnen zijn voor een adequate diagnostiek van vispathogene micro-organismen.

De DNA diagnose

Elk levend organisme draagt genetische informatie met zich mee die vervat zit in zijn DNA. Die informatie is zeer specifiek zodat men op die basis zelfs een muis van een olifant kan onderscheiden maar ook of iemand aanleg heeft om bepaalde ziekten in zijn leven te ontwikkelen. Zo heeft ook elke bacterie een stukje in zijn DNA dat zo specifiek is voor zijn soort dat men door dat concrete stukje aan te tonen exact kan bepalen welke bacterie men precies aan het onderzoeken is en dat geldt evenzeer voor het bepalen van virussoorten.

Dit principe bestaat eigenlijk al redelijk lang en zal iedereen kennen als ik zeg dat de huidige test voor het aantonen van het *Koi Herpes Virus (CyHV3)* hierop gebaseerd is (de KHV-PCR test). Deze nieuwe test, de DNA Multiscan[®], gaat nog een stap verder en kan in één enkele test een veelvoud van DNA stukjes detecteren en van elkaar onderscheiden.

DNA-rooster multiplexing

In theorie heb je oneindig veel mogelijkheden om hier verder mee te werken. Naast het opsporen van plantenziekten werd ook reeds een test ontwikkeld om ziekteverwekkende organismen in voedsel op te sporen. Nu is dit dus uitgebreid naar het detecteren van visziekten. Maar hoe werkt het nu precies?

In een rooster worden per vakje stukjes DNA van gekende ziekteverwekkende bacteriën en virussen vast gekleefd. Wanneer de dierenarts een staal opstuurt wordt dat staal zodanig bewerkt dat alle DNA dat erin aanwezig is verzameld wordt. Een oplossing van die verzameling van onbekende DNA stukjes wordt dan in contact gebracht met het vooraf geprepareerde rooster en wanneer er na enige reactietijd identieke stukjes elkaar terug vinden gaat er op die plaats zeer simplistisch uitgelegd een lichtje branden. Doordat we exact weten welke ziektekiemen zich op welke plaats in het rooster bevinden kunnen we aan de hand van die lichtjes precies weten welke ziektekiemen aanwezig zijn. Je leest het dus goed dat alle op dat moment aanwezige ziekteverwekkers in het staal gedetecteerd kunnen worden op hetzelfde moment. Bovendien kan men aan de sterkte van die lichtjes afleiden hoe zwaar besmet het staal is.

Revolutionair

Het mag al duidelijk zijn dat deze test een ware revolutie kan betekenen voor de diagnose van visziekten. Vooral voor de commerciële vissoorten zal men nu ziekten die voordien zeer moeilijk op te sporen waren snel en accuraat kunnen aantonen, bijvoorbeeld ook ziekten die een gevaar betekenen voor de volksgezondheid (oa. tuberculose & vibriose) zullen nu snel op te sporen zijn. Ook bij de import/export van vis zal men een belangrijk werkinstrument hebben om vis al dan niet het land in te laten. Zieke vissen of vissen waar gevaarlijke ziekten zoals het *Koi Herpes Virus* in gedetecteerd worden kunnen dan bijvoorbeeld meteen een halt toegeroepen worden zodat ze niet de handelaar zijn, visbestand noch het uwe gaan besmetten. Op vlak van preventie kunnen in een vroeg stadium risicogroepen gescreend worden, bijvoorbeeld vissen in een stresssituatie die vatbaarder zijn om aanwezige kiemen tot ontwikkeling te brengen. In de praktijk is de test bijvoorbeeld ook al ingezet geweest door een slimme handelaar die van bij de verschillende kwekers waar hij vis wou kopen stalen had

meegebracht voor analyse. Op basis van de bekomen resultaten kon hij nog bepaalde bestellingen annuleren.

Toekomst

Toch staan er voor de toekomst nog verschillende uitdagingen te wachten die de nieuwe test kunnen optimaliseren en aanvullen. Het aantonen van een ziekte is natuurlijk één zaak, maar inschatten hoe agressief de kiem zal zijn of hoe weerbaar ten opzichte van antibiotica (resistentie) is daarmee nog niet gezegd. Aangezien ook die eigenschappen geschreven staan in het DNA van organismen kan men binnenkort, na het terugvinden van welke genen hier precies verantwoordelijk voor zijn, deze integreren in de test en wordt het uiteindelijke resultaat nog een stuk interessanter.

Wanneer in de toekomst nieuwe ziekten zouden gaan opduiken kunnen die relatief eenvoudig nog aan de diagnosekit toegevoegd worden. De test is immers in principe onbeperkt uitbreidbaar. Ook omgekeerd speelt de gedachte om deze test in te perken en specifiek voor de siervissector of consumptievissector te ontwikkelen, of wil je nog specifiek dan wordt een kit gemaakt die enkel op zoek gaat naar ziekteverwekkers die bij koi kunnen voorkomen (differentiële diagnostiek). Ziekten die daar totaal onmogelijk zijn worden dan niet onnodig extra getest.

Ook wordt hard gewerkt aan de ontwikkeling van een expertsysteem waarbij abiotische parameters (bijvoorbeeld waterkwaliteitswaarnemingen) kunnen worden gekoppeld aan de gevonden ziekte(n) (epidemiologische bewaking). Hierdoor kunnen we uiteindelijk op voorhand voorspellen wanneer bepaalde ziekten zich kunnen gaan voordoen.

Rol van de dierenarts/specialist

Als lid van de gebruikerscommissie heb ik de ontwikkeling van deze test op de voet kunnen volgen, uitgebreid kunnen testen en helpen optimaliseren. Na meer dan 200 praktijkstalen in te brengen en te laten testen, te vergelijken met erbij horende klinische en labodiagnosen heb ik de mogelijkheden van de test in de siervissector al goed kunnen aftasten en inschatten. Sowieso creëert dit belangrijke mogelijkheden. Op 36u tijd een betrouwbare diagnose verkrijgen waarin tegelijkertijd belangrijke ziekteverwekkers zoals *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium* spp., *Vibrio* spp. of *Koi Herpes Virus* al of niet aanwezig gesteld worden en bovendien ook nog eens een indicatie van hun aantal weergeven is fenomenaal. Bij de dierenarts/specialist rust nu de belangrijke taak om correct in te schatten wat van die informatie prioritair en relevant is en bij het betreffend klinische geval de best passende behandeling zal zijn om het gevaar een halt toe te roepen of preventief in te grijpen.

Veel hangt af van het aanleveren van een representatief staal. Men kan de beste test van de wereld hebben maar zonder goed staal sta je nog nergens. Of op het juiste moment het juiste orgaan bemonsterd wordt zal doen bepalen of de juiste diagnose gesteld of gemist wordt.

Ter afsluiting

Ik pleit echter wel nog voor enige voorzichtigheid. Bijvoorbeeld voor het *Koi Herpes Virus* kennen we nog te weinig over deze ziekte om al bij het minste positief signaal aan de alarmbel te gaan trekken en bijvoorbeeld over opruimingsacties te gaan spreken. Dit virus is ondertussen reeds aangetoond bij goudvissen, guppy's en zelfs in bodemslijk. Vaak wil een krachtig positief signaal zelfs niet betekenen dat alle vissen ten dode opgeschreven zijn. In vijvers waar in 2007 zeker het *Koi Herpes Virus* is toegeslagen maar waar door snel en adequaat in te grijpen nagenoeg geen vissterfte is opgetreden, is na herhaaldelijk testen van

diverse soorten stalen op diverse tijdstippen geen *Koi Herpes Virus* meer te bespeuren. Verder wetenschappelijk onderzoek naar dragerschap, verspreiding, virulentiegraad en dergelijke is hier mijn inziens onontbeerlijk alvorens de overheid enige dwingende maatregelen kan gaan opleggen wil onze hobby even genietbaar blijven als hij nu is!

Tekst als uitleg bij de afbeeldingen figuur 1 en figuur 2 :

Voorbeeld van een diagnosemembraan voor snelle multiplex detectie en identificatie van een set ziekteverwekkers. Elke positie bevat een 'detector' voor een bepaalde ziekteverwekker.

Een positieve detectie wordt weergegeven door een zwart signaal.

Op figuur 1 (een staal van de kieuw van een koi) is een positief signaal te zien voor *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Pseudomonas anguilliseptica* en *Vibrio anguillarum*.

Op figuur 2 zijn 3 stalen afgebeeld, 1 ervan is negatief, op het 2^e staal is *Flavobacterium columnare* af te lezen en op het derde worden *Aeromonas spp.* gedetecteerd.