



FUNKČNÍ VZOREK

**Metoda detekce protilátek proti bakterii
Haemophilus (Glaesserella) parasuis
s využitím rekombinantního proteinu kataláza**

**Mgr. Lenka Kavanová, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
RNDr. Jiří Salát, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

5684/2019

Funkční vzorek

Metoda detekce protilátek proti bakterii *Haemophilus (Glaesserella) parasuis* s využitím rekombinantního proteinu kataláza

Mgr. Lenka Kavanová, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
RNDr. Jiří Salát, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

2019

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.

ISBN 978-80-88233-79-4

Obsah

<u>Úvod</u>	3
1. <u>Cíl metodiky</u>	3
2. <u>Vlastní popis metodiky</u>	3
2.1. <u>Rekombinantní protein kataláza</u>	3
2.2. <u>Metodika ELISA testu</u>	4
2.3. <u>Validace ELISA testu</u>	4
3. <u>Srovnání novosti postupů</u>	7
4. <u>Uplatnění funkčního vzorku</u>	7
5. <u>Ekonomické aspekty</u>	7
6. <u>Seznam použité literatury</u>	7
7. <u>Dedikace</u>	8

Úvod

Haemophilus (Glaesserella) parasuis je jedním z nejdůležitějších bakteriálních patogenů v chovech prasat. *H. parasuis* je aerobní, nepohyblivá bakterie polymorfního tvaru řazena do čeledi *Pasteurellaceae* (Macedo a kol., 2015).

V současné době je popisováno 15 sérotypů s rozdílnou virulencí (Howell a kol., 2013). Nevirulentní kmeny této bakterie se běžně vyskytují v horních cestách dýchacích zdravých prasat. Virulentní kmeny však způsobují vážná respirační onemocnění spojená s akutní septikémií, případně systémová onemocnění jako je Glässerova choroba, pro níž jsou charakteristické fibrinozní polyserositidy, polyartritidy a meningitida (Amano a kol., 1994). K přenosu nákazy je ve většině případů potřeba přímý kontakt (Brockmeier a kol., 2013).

Mechanismy spojené s virulencí (virulentní faktory) jednotlivých kmenů bakterie *H. parasuis* nejsou v současné době dostatečně prozkoumány (Costa-Hurtado a Aragon, 2013). Jedním z možných virulentních faktorů je enzym kataláza. Tento enzym je významný antioxidant chránící bakterie proti reaktivním metabolitům kyslíku vytvářeným makrofágy v odpovědi na bakteriální infekci. Kataláza je umístěna v periplasmatickém prostoru bakterie *H. parasuis* a je vysoce imunogenní (Frangoloso a kol., 2011). Jednou z možností, jak u zvířat diagnostikovat tuto infekční chorobu je ELISA test (enzyme-linked immunosorbent assay) test detekující specifické protilátky v séru zvířete.

1. Cíl metodiky

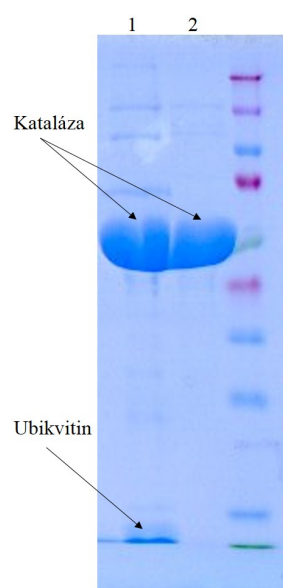
Cílem metodiky bylo zavést a validovat ELISA test ke stanovení specifických protilátek proti bakterii *Haemophilus parasuis* s využitím rekombinantní katalázy.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Rekombinantní protein kataláza

Jako antigen pro stanovení protilátek proti bakterii *Haemophilus parasuis* pomocí ELISA testu byl zvolen rekombinantní protein kataláza. Pomocí PCR byla amplifikována sekvence genu kódující katalázu (hktE) z genomické DNA terénního kmene CAMP 6475 (Sbírka

zoopatogéních mikroorganismů, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno) izolovaného z mozku uhynulého prasete (sérovar 5). Amplifikovaná sekvence byla klonována do expresního vektoru, který byl transformován do bakterií kmene *E. coli* DH10B. Poté byla izolována plazmidová rekombinantní DNA a transformována do produkčního kmene *E. coli* BL21. Po indukci se produkoval protein kataláza, který měl na svém N-konci polyhistidinovou kotvu umožňující jeho purifikaci, a která byla po přečištění odštěpena pomocí TEV-polymerázy a odstraněna pomocí gelové chromatografie (GPC).



Obr. 1:

Purifikace rekombinantního proteinu katalázy. (1) Před purifikací odštěpené polyhistidinové kotvy. (2) Po purifikaci na GPC.

2.2. Metodika ELISA testu

Jako antigen byl použit rekombinantní protein kataláza o koncentraci 1 $\mu\text{g/mL}$, který byl navázán na dna jamek mikrotitračních destiček (Maxisorb, NUNC) v karbonát-bikarbonátovém purfu (0.05 M, pH 9,6) v objemu 100 μL . Destičky byly s antigenem inkubovány po dobu 16 hodin při teplotě 4°C. Jamky byly promyty 4 \times 300 μL promývacího roztoku (PBS, 0,05% Tween-20) a nespecifická vazebná místa byla blokována pomocí blokovacího roztoku (200 μL) obsahujícího PBS, 0.5% kasein a 10% sacharózu po dobu 30 min při teplotě 37°C. Po odstranění blokovacího roztoku byly napipetovány vzorky sér (100 μL) a inkubovány 1 hodinu při teplotě 37°C. Vyšetřované vzorky byly ředěny 100 \times ředícím roztokem (PBS, 0.5% kaseinový hydrolyzát; 0.05% Tween-20). Po inkubaci byly destičky promyty 4 \times 300 μL promývacího roztoku a následně bylo přidáno 100 μL proteinu G značeného křenovou peroxidázou (Thermo Fisher Scientific) ředěného v poměru 1:10 000 v ředícím roztoku. Po inkubaci při 37°C po dobu 1 hodiny byly jamky promyty 4 \times 300 μL

promývacího roztoku a bylo přidáno 100 μ L substrátu TMB-Complete 2 solution (TestLine). Reakce byla zastavena po 15 min 50 μ L 1M kyseliny sírové a výsledná absorbance byla odečítána pomocí spektrofotometru při 450 nm (Synergy H1, Biotek Instrumentals).

2.3. Validace ELISA testu

Pro validaci ELISA testu byla použita séra myši z vakcinačního experimentu, kde myši byly imunizovány antigenem - rekombinantní kataláza *H. parasuis*. Jako séra negativní na přítomnosti protilátek proti kataláze byla použita séra neimunizovaných myši ze stejného experimentu.

2.3.1. Homogenita potažení destičky

Test byl proveden na jedné mikrotitrační destičce dané výrobní šarže s jedním vzorkem séra pozitivního na přítomnost protilátek proti kataláze *H. parasuis* dle pracovního postupu uvedeného výše. Vypočtena byla průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběru a koeficient variance. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1.: Test homogenity potažení mikrotitrační destičky antigenem rekombinantního proteinu katalázy.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,738	0,768	0,723	0,715	0,748	0,825	0,796	0,774	0,778	0,752	0,767	0,724
B	0,749	0,673	0,647	0,651	0,658	0,692	0,688	0,706	0,707	0,693	0,707	0,758
C	0,738	0,661	0,632	0,640	0,653	0,677	0,669	0,662	0,678	0,699	0,678	0,761
D	0,753	0,644	0,648	0,656	0,648	0,657	0,683	0,675	0,681	0,694	0,670	0,750
E	0,709	0,655	0,637	0,640	0,649	0,647	0,644	0,660	0,678	0,685	0,674	0,721
F	0,741	0,643	0,642	0,647	0,648	0,658	0,672	0,661	0,673	0,675	0,682	0,724
G	0,700	0,666	0,661	0,637	0,668	0,668	0,677	0,678	0,669	0,685	0,711	0,719
H	0,751	0,699	0,686	0,703	0,725	0,725	0,755	0,740	0,767	0,723	0,756	0,721

Vypočítané hodnoty:

Průměrná hodnota absorbance: 0.695

Směrodatná odchylka výběru: 0.043

Koeficient variance: 6.192

2.3.2. Opakovatelnost – intra-assay

Test byl proveden na jedné mikrotitrační destičce dané výrobní šarže se čtyřmi vzorky v zastoupení dvou pozitivních vzorků (P1, P2) séra s vysokým titrem protilátek proti kataláze poskytující vysoké hodnoty absorbance a dvou vzorků negativních (N1, N2). Vzorky byly testovány ve čtyřadvaceti replikacích dle výše uvedeného pracovního postupu. Vypočtena byla průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběru a koeficient variance. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2.: Výsledky testu opakovatelnosti (intra-assay) pro antigen kataláza.

Číslo měření	P1	N1	P2	N2
1	0.84	0.049	0.753	0.049
2	0.797	0.046	0.685	0.047
3	0.804	0.046	0.691	0.046
4	0.821	0.045	0.676	0.046
5	0.815	0.047	0.673	0.047
6	0.829	0.046	0.688	0.047
7	0.855	0.047	0.689	0.048
8	0.805	0.049	0.75	0.049
9	0.772	0.049	0.733	0.05
10	0.768	0.047	0.694	0.049
11	0.715	0.046	0.669	0.047
12	0.769	0.046	0.681	0.047
13	0.752	0.046	0.671	0.047
14	0.758	0.045	0.689	0.048
15	0.799	0.046	0.689	0.048
16	0.826	0.048	0.726	0.049
17	0.786	0.048	0.698	0.05
18	0.734	0.046	0.686	0.05
19	0.741	0.045	0.682	0.048
20	0.753	0.045	0.678	0.048
21	0.756	0.046	0.674	0.049
22	0.737	0.045	0.685	0.049
23	0.751	0.046	0.687	0.049
24	0.819	0.048	0.771	0.05

Počet testů	24	24	24	24
Průměr absorbancí	0.783	0.047	0.697	0.048
Směrodatná odchylka	0.0372	0.001	0.028	0.001
Variační koeficient (%)	4.750	2.772	3.957	2.539
Směrodatná odchylka pro celý rozsah	0.017			
Variační koeficient pro celý rozsah (%)	3.504			

2.3.3. Opakovatelnost – inter-assay

Test byl proveden na deseti mikrotitračních destičkách jedné výrobní šarže. Byly testovány 4 vzorky – dva s nízkou a dva s vysokou pozitivitou. Každý vzorek byl testován v kvadruplikátu dle výše uvedeného postupu. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběru a koeficient variance. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3.: Výsledky testu opakovatelnosti (inter-assay) pro antigen kataláza.

	Vzorek 1		Vzorek 2		Vzorek 3		Vzorek 4	
1	0.201	0.180	0.136	0.141	0.220	0.235	0.601	0.613
	0.210	0.190	0.143	0.142	0.228	0.218	0.578	0.633
2	0.209	0.192	0.149	0.149	0.225	0.218	0.584	0.633
	0.212	0.188	0.143	0.144	0.226	0.229	0.620	0.667
3	0.199	0.178	0.142	0.139	0.220	0.222	0.599	0.607
	0.191	0.180	0.141	0.135	0.207	0.209	0.569	0.582
4	0.199	0.188	0.142	0.131	0.207	0.208	0.519	0.592
	0.201	0.190	0.142	0.136	0.221	0.216	0.546	0.612
5	0.195	0.181	0.146	0.141	0.220	0.221	0.594	0.614
	0.198	0.197	0.142	0.143	0.209	0.205	0.548	0.578
6	0.207	0.207	0.156	0.153	0.238	0.241	0.736	0.631
	0.213	0.210	0.157	0.158	0.258	0.240	0.713	0.587
7	0.210	0.198	0.152	0.156	0.212	0.217	0.733	0.562
	0.200	0.181	0.136	0.151	0.216	0.227	0.722	0.578
8	0.199	0.192	0.135	0.134	0.227	0.235	0.538	0.618
	0.207	0.195	0.141	0.134	0.223	0.236	0.574	0.522
9	0.202	0.212	0.147	0.138	0.207	0.206	0.545	0.567
	0.211	0.181	0.140	0.140	0.214	0.205	0.569	0.539
10	0.211	0.179	0.129	0.137	0.205	0.206	0.558	0.531
	0.203	0.180	0.137	0.142	0.204	0.208	0.526	0.571

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4
Počet testů	40	40	40	40
Průměr absorbancí	0.197	0.143	0.220	0.595
Směrodatná odchylka	0.011	0.007	0.013	0.056
Variační koeficient (%)	5.656	5.053	5.710	9.357
Směrodatná odchylka pro celý rozsah	0.022			
Variační koeficient pro celý rozsah (%)	6.444			

3. Srovnání novosti postupů

Detekce specifických protilátek proti kataláze *H. parasuis* není podle našich informací v současné době používána.

4. Uplatnění funkčního vzorku

ELISA test je využíván na pracovišti autorů k výzkumným účelům. Potenciální komerční využití je možné pro stanovení hladiny protilátek proti bakterii *H. parasuis* u prasat.

5. Ekonomické aspekty

Komerční využití ELISA testu nelze odhadnout. Možné ekonomické aspekty závisí na zájmu chovatelů.

6. Seznam použité literatury

Amano H, Shibata M, Kajio N, Morozumi T (1994). Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J Vet Med Sci* 56, 639-644.

Brockmeier SL, Loving CL, Mullins MA, Register KB, Nicholson TL, Wiseman BS, Baker RB, Kehrlí ME Jr (2013). Virulence, transmission, and heterologous protection of four isolates of *Haemophilus parasuis*. *Clin Vaccine Immunol* 20(9):1466-72.

Costa-Hurtado M, Aragon (2013). Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. *Vet J* 198(3):571-6.

Frاندoloso R, Martínez S, Rodríguez-Ferri EF, García-Iglesias MJ, Pérez-Martínez C, Martínez-Fernández B, Gutiérrez-Martín CB (2011). Development and characterization of protective *Haemophilus parasuis* subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin and comparison with other subunit and commercial vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 18(1):50-8.

Howell KJ, Weinert LA, Luan SL, Peters SE, Chaudhuri RR, Harris D, Angen O, Aragon V, Parkhill J, Langford PR, Rycroft AN, Wren BW, Tucker AW, Maskell DJ (2013). Gene content and diversity of the loci encoding biosynthesis of capsular polysaccharides of the 15 serovar reference strains of *Haemophilus parasuis*. *J Bacteriol* 195(18):4264-73.

Macedo N, Rovira A, Torremorell M (2015). *Haemophilus parasuis*: infection, immunity and enrofloxacin. *Vet Res* 46:128.

7. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz