



FUNKČNÍ VZOREK

**Nepřímý ELISA test pro stanovení specifických
protilátek IgY proti *Streptococcus uberis* ve vzorcích
slepičích sér a purifikovaných IgY z vaječných žloutků**

**Mgr. Karolina Hlavová, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.
Mgr. Šárka Kobzová
Mgr. Hana Štěpánová, Ph.D.**

3270
2023

Funkční vzorek 3270/2023

Nepřímý ELISA test pro stanovení specifických protilátek IgY proti *Streptococcus uberis* ve vzorcích slepičích sér a purifikovaných IgY z vaječných žloutků

Mgr. Karolina Hlavová, Ph.D.

MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.

Mgr. Šárka Kobzová

Mgr. Hana Štěpánová, Ph.D.

ISBN 978-80-7672-035-0

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu s názvem „Veterinární léčebný přípravek na bázi obohacení protilátkami IgY“, registrační číslo CZ.01.1.02/0.0/0.0/20_321/0024962, který je spolufinancován Ministerstvem průmyslu a obchodu jako řídicí orgán Operačního programu Podnikání a inovace pro konkurenceschopnost.

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku.....	4
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku	4
3.1. Příprava antigenu a imunizace.....	4
3.2. Metodika ELISA reakce.....	5
4. Ověření metodiky funkčního vzorku.....	6
5. Srovnání novosti postupů	7
6. Popis uplatnění funkčního vzorku.....	8
7. Ekonomické aspekty	8
8. Seznam použité literatury.....	8
9. Dedikace.....	9

1. Úvod

Streptococcus uberis je jedním z nejčastěji izolovaných původců mastitid, které způsobují v chovech dojnic velké ekonomické ztráty, ať už snížením produkce a kvality mléka, vznikem nákladů vynaložených na léčbu, anebo také ztrátami způsobenými vyřazováním dojnic s perzistentními infekcemi a opakujícími se záněty (Hogeveen et al. 2011). *S. uberis* řadíme mezi environmentální streptokoky, vyskytuje se všude v prostředí stájí i na pastvě, zejména v místech, kde se krávy shromažďují a kde odpočívají. Kmeny *S. uberis* se vyznačují velkou genetickou variabilitou a některé kmeny *S. uberis* však mohou být více adaptovány na mléčnou žlázu krávy a tyto kmeny pak vykazují různou míru kontagiozity a šíří se přímo z krávy na krávu, pravděpodobně během procesu dojení. Tyto kmeny jsou schopny perzistovat v mléčné žláze a způsobují rekurentní, chronické infekce (Phuektes et al. 2001).

Intramamární infekce *S. uberis* je spojována se subklinickou i klinickou mastitidou, a to jak u dojnic laktujících, tak i u dojnic mimo laktaci. K infekci mléčné žlázy dochází nejčastěji v období stání na sucho (cca 60 %), s následným propuknutím klinické mastitidy v následující laktaci (Kromker et al. 2014).

K léčbě intramamárních infekcí způsobených *S. uberis* je doporučováno použití penicilinů, protože streptokoky jsou známy svou dobrou citlivostí k penicilinům (Bradley 2002, Käppeli et al. 2019). Recentní studie však dokládají pomalý, ale viditelný pokles citlivosti izolátů *S. uberis* k beta-laktamům (Haenni et al. 2018). Z důvodu celosvětově se zvyšující antibiotické resistance způsobené nadužíváním antimikrobik se na mezinárodní i lokální úrovni doporučuje snižovat jejich užití, zvyšovat efektivní cílenou léčbu a hledat alternativní neantibiotické preparáty (O'Neil, 2016).

Jednou z možných alternativ antibiotických preparátů je využití specifických protilátek. Vhodným zdrojem mohou být protilátky IgY z vaječného žloutku. Skutečnost, že vejce slepic i ostatních ptáků obsahují protilátky, je známa již déle jak 100 let (Klemperer, 1893). Protilátky jsou koncentrovány ve vaječných žloutcích, do nichž přestupují z krevního séra nosnic v průběhu ovogeneze (Mohammed et al., 1998). Tyto protilátky svojí strukturou i biologickou funkcí odpovídají imunoglobulinům savců izotypu IgG. S ohledem na skutečnost, že jsou ve vysoké koncentraci nacházeny ve vaječných žloutcích, bývají obvykle nazývány jako imunoglobuliny IgY (žloutek-angl. yolk). IgY protilátky se svojí stavbou a zejména pak funkcí významně neliší od podobných imunoglobulinů savců včetně člověka a hrají podobnou roli jako kolostrální protilátky. Protilátky izolované z vaječných žloutků cíleně imunizovaných slepic se stávají stále častěji prostředkem v léčbě a prevenci chorob lidí a zvířat (Schade a kol. 2005).

IgY protilátky jsou schopny plnit většinu funkcí, které běžně plní protilátky savců. V biologických systémech působí jako neutralizační protilátky, které oddělují adhezivní molekuly patogenních mikroorganismů od jejich receptorů na povrchu cílových buněk. Tímto způsobem zabraňují jejich

infekci, neboť valná většina patogenního působení bakterií a virů je podmíněna zachycením se na povrchy buněk. Pokud jsou adhezivní molekuly na povrchu patogenních virů a bakterií obaleny specifickými protilátkami, jejich adhezivní schopnost je zablokována. Takto neutralizované mikroorganismy jsou snadno vyloučeny přirozenými bariérovými mechanismy (Akita a Nakai, 1993). Uvedené vlastnosti mohou být využity zejména v případech zevních nebo slizničních aplikací. Slepičí IgY mají ve srovnání s jinými protilátkami při použití k pasivní imunoterapii řadu výhod, jejich administrace nevede k rozvoji adaptivní imunitní odpovědi proti IgY (Nilsson a kol., 2007) a IgY neaktivují savčí komplement (Kovacs-Nolan a Mine, 2012).

Pro léčbu mastitid byly již testovány IgY specifické vůči *Staphylococcus aureus* (Zhang et al, 2016), což podporuje tezi možného využití protilátek z vaječných žloutků jako alternativní terapii i proti dalšímu původci bovinní mastitidy – *S. uberis*.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem předloženého funkčního vzorku je sestavení metody ELISA pro stanovení specifických IgY protilátek, izolovaných z vaječné hmoty (melanže) a ze séra slepic imunizovaných *S. uberis*, který je původcem bovinní mastitidy. Předložený postup zahrnuje: přípravu antigenů pro imunizaci, postup imunizace a ověření přítomnosti protilátek nepřímým ELISA testem.

3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku

3.1. Příprava antigenu a imunizace

3.1.1. Kultivace bakterií

Revitalizované bakterie (kmeny *S. uberis* 94 a *S. uberis* 369) byly vyočkovány na krevní agar s 5% beraní krví (LabmediaServis), kultivace proběhla při teplotě 37°C a přes noc. Následně byly bakterie smyty do PBS (Lonza). Bakteriální suspenze byla naředěna na optickou denzitu 5,4 McF. Následně byly takto připravené kultury obou kmenů smíchány v poměru 1:1.

3.1.2. Příprava lyofilizátu

Z bakteriální suspenze (kmeny *S. uberis* 94 a *S. uberis* 369 1:1) OD 5,4 McF v PBS. byly centrifugací odděleny bakterie od PBS a fixovány v 8% formaldehydu 1h. Následně byly dvakrát promyty PBS a rozsuspendovány na původní objem suspenze. V alikvotech 1ml byla suspenze lyofilizována. Lyofilizované imunizační dávky byly uchovány v -20°C.

3.1.3. Příprava imunizační dávky a imunizace

Pro imunizaci byl lyofilizát rozpuštěn v apyrogení deionizované vodě do původního objemu. V poměru 1:1 byl získaný roztok důkladně promísen s Freundovým kompletním adjuvans (Freund's Adjuvant, Complete, Sigma Aldrich) pro primovakcinaci a s Freundovým inkompletním adjuvans (Freund's Adjuvant, Incomplete, Sigma Aldrich) pro revakcinace. Vakcinační dávka byla každému zvířeti podána intramuskulárně do prsního svalu v celkovém objemu 1ml. Revakcinace proběhla 3 týdny po primovakcinaci a následně byla opakována vždy 1x měsíčně.

3.2. Metodika ELISA reakce

3.2.1. Vazba antigenu

ELISA test byl připraven potažením jamek mikrotitrační desky Maxisorp (Nunc, Dánsko) inaktivovanými bakteriálními suspenzemi *S.uberis* kmeny 94, 369, 71 a 160 OD 5,4 McF v pracovním ředění 1:100 v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 µl na jamku (inkubace přes noc, 4°C). Následně byly desky 5x promyty PBS s obsahem 0,05 % Tween 20 (PBS-T, pH 7,2).

3.2.2. Blokace nespecifických vazebných míst

Do jamek bylo napipetováno 200 µl roztoku PBS obsahujícího 0,5% kaseinového hydrolyzátu a 10% sacharózy. Poté se deska inkubovala při pokojové teplotě 5 minut, následně byl její obsah odstraněn odsátím a vysušen 30min při teplotě 37°C.

3.2.3. Aplikace vzorků

Vyšetřované vzorky sér byly ředěny 300x a purifikované IgY z vaječných žloutků byly ředěny 1000x v roztoku PBS-T s přidavkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 µl byly aplikovány do jamek mikrotitrační desky a testovány vždy v duplikátech. Inkubace probíhala 60minut při pokojové teplotě. Jamky byly opět 5x promyty roztokem PBS-T.

3.2.4. Aplikace konjugátu

Do jamek byla přidána 30 000x ředěná sekundární protilátka konjugovaná křenovou peroxidázou (Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule)–Peroxidase antibody, produced in rabbit (Sigma-Aldrich)) v objemu 100 µl na jamku v ředícím roztoku (PBS, 0,5% Tween a 0,5% kaseinový hydrolyzát). Inkubace probíhala při pokojové teplotě 30 minut. Po inkubaci byly jamky opět 5x promyty roztokem PBS-T.

3.2.5. Aplikace substrátu

Do jamek byl aplikován substrát s chromogenem TMB complete (Test-line, Česká republika) v objemu 100 µl do každé jamky, který se nechal působit po dobu 10 minut.

3.2.6. Zastavení reakce

Pro zastavení reakce byla přidána 1M H₂SO₄ v objemu 50 µl do každé jamky.

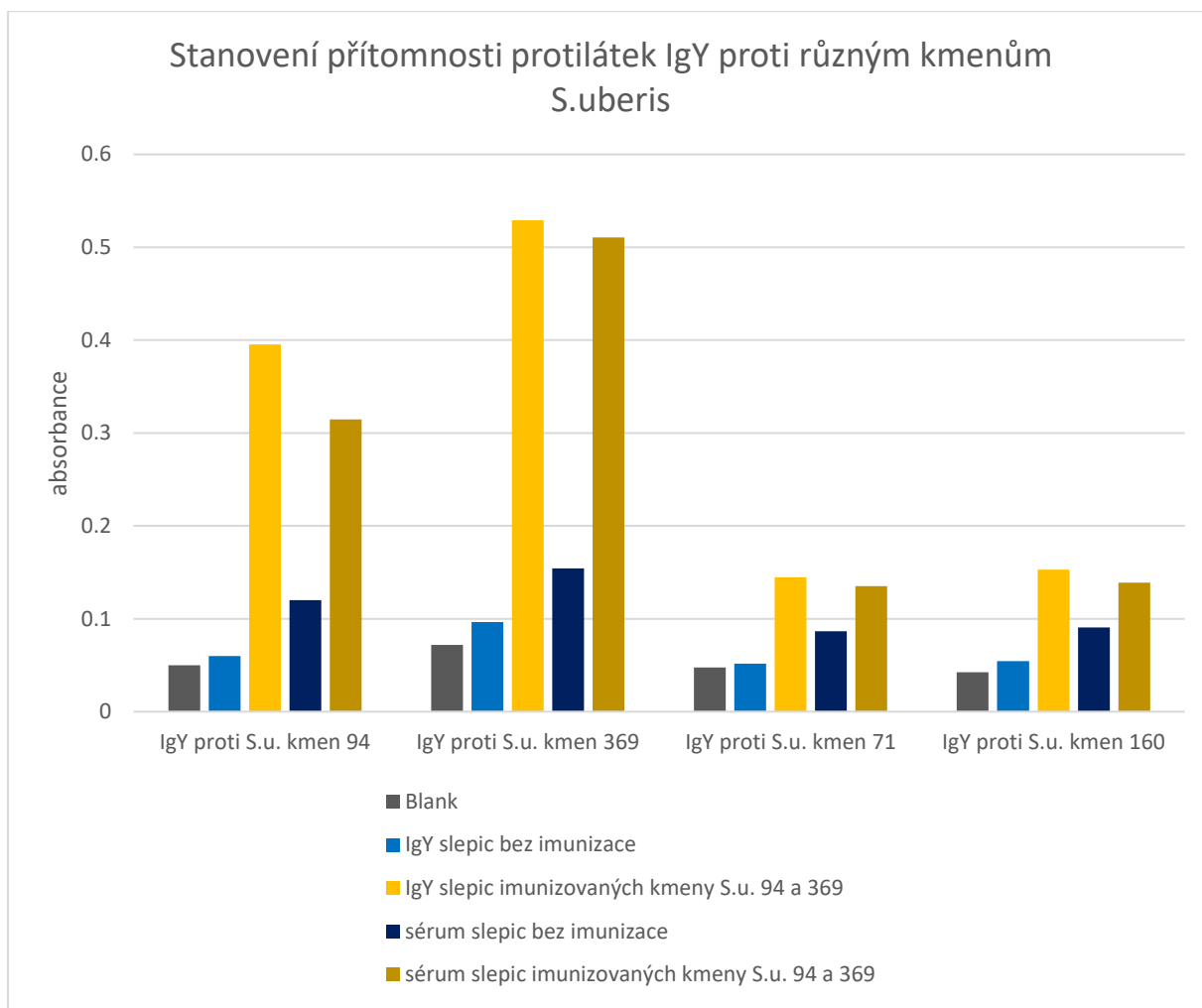
3.2.7. Měření absorbance

Absorbance byla měřena při 450 nm pomocí multikanálového spektrofotometru Synergy H1 (BioTek, USA).

Pracovní ředění antigenu a konjugátu bylo ověřeno boxovou titrací se vzorky sér imunizovaných slepic.

4. Ověření metodiky funkčního vzorku

Metodika byla ověřena stanovením přítomnosti specifických protilátek izotypu IgY proti 4 kmenům (94, 369, 71 a 160) *S.uberis* ve vzorcích sér imunizovaných i neimunizovaných slepic a ve vzorcích IgY purifikovaných z vaječných žloutků imunizovaných i neimunizovaných slepic. Zvířata byla imunizována kmeny *S.uberis* 94 a 369. Výsledky ověření jsou uvedeny v grafu 1.



Graf 1: Stanovení přítomnosti protilátek IgY proti různým kmenům S.uberis

Úroveň absorbance je přímo úměrná koncentraci protilátek IgY ve vzorku. Významně vyšší absorbanci – koncentraci specifických IgY můžeme sledovat jak v séru, tak i v purifikovaných IgY z vaječných žloutků imunizovaných slepic především proti kmenům 94 a 369, proti nimž byla zvířata imunizována.

5. Srovnání novosti postupů

ELISA metoda pro detekci specifických protilátek IgY ze vzorků séra slepic, nebo purifikovaných z vaječných žloutků není komerčně dostupná. Zde předkládaná metoda umožňuje detekci a semikvantifikaci specifických IgY proti 4 rozličným kmenům *S. uberis* s nízkou hladinou nespecifické vazby u vzorků z neimunizovaných zvířat.

6. Popis uplatnění funkčního vzorku

ELISA metoda pro stanovení specifických protilátek IgY proti různým kmenům *S. uberis* je používána v laboratoři autorů k výzkumným účelům.

Potenciál dalšího využití metody je v kontrolním stanovení protilátek v profylaktických preparátech cílených proti *S. uberis*, původci mastitidy u dojného skotu, založených na specifických IgY z vaječných žloutků imunizovaných slepic.

7. Ekonomické aspekty

Metoda je na pracovišti autorů zavedena a připravena k použití. Je plně využitelná k detekci specifických IgY v preparátech připravených v rámci projektu „**Veterinární léčebný přípravek na bázi obohacení protilátkami IgY**“. Případné další komerční využití záleží na poptávce potenciálních zákazníků. V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout.

Cena jednotlivých vyšetření bude závislá na množství vyšetřených vzorků.

8. Seznam použité literatury

Akita, E.M., Nakai, S.: Production and purification of Fab fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *J. Immunol. Methods*, 1993, 162:155-164.

Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 164:116–28.

Haenni, M., Lupo, A., Madec, J. 2018. Antimicrobial resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiol. Spectr* 6:1–25.

Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J. 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *NZ Vet J.* 59:16–23.

Käppeli, N., Morach, M., Zurfluh, K., Corti, S., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R. 2019. Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated From Bovine Mastitis. *Frontiers in veterinary science* 6:234.

Klemperer, F.: Über natürliche immunität und ihre verwertung für die immunisierungstherapie. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1893, 31:356-382.

Kovacs-Nolan, J., Mine, Y.: Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3:163-182.

Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J.H., Grabowski, N. 2014. Bovine Streptococcus uberis Intramammary Infections and Mastitis. Clin Microbiol 3:157

Mohammed, S.M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K.R., Wildeman, A.G., Bonselaar, J., Etches, R.J. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. Immunotechnology, 1998, 4:115-125.

Nilsson, E., Kollberg, H., Johannesson, M., Wejåker, P.E., Carlander, D., Larsson, A.: More than 10 years' continuous oral treatment with specific immunoglobulin Y for the prevention of Pseudomonas aeruginosa infections: a case report. J. Med. Food. 2007; 10:375-378.

O'Neil Report (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. Available online at: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

Phuektes, P., Mansell, P.D., Dyson, R.S., Hooper, N.D., Dick, J.S. 2001. Molecular epidemiology of Streptococcus uberis isolates from dairy cows with mastitis. J Clin Microbiol 39:1460-1466.

Schade, R., Calzado, E.G., Sarmiento, R., Chacana, P.A., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H.R.: Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern. Lab. Anim., 2005, 33:129- 154.

Zhen YH, Jin LJ, Li XY, Guo J, Li Z, Zhang BJ, Fang R, Xu YP, 2009. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus. Vet Microbiol. 133(4):317-22.

9. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu s názvem „Veterinární léčebný přípravek na bázi obohacení protilátkami IgY“, registrační číslo CZ.01.1.02/0.0/0.0/20_321/0024962, který je spolufinancován Ministerstvem průmyslu a obchodu jako řídicí orgán Operačního programu Podnikání a inovace pro konkurenceschopnost.

VU^{Ve}L 

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