

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246485 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442091**

(22) Data zgłoszenia: **2022.08.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.02.26 BUP 09/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.03 WUP 05/2025**

(51) MKP:

G01N 33/569 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

ANNA DOBRUT, Kraków, PL

DAGMARA WÓJCIK-GRZYBEK, Kraków, PL

MONIKA BRZYCHCZY-WŁOCH, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL

Uwaga: Wykaz sekwencji w postaci elektronicznej jest dostępny
na stronie internetowej Urzędu Patentowego RP

(54) Tytuł:

**Sposób i kompozycja diagnostyczna do wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*,
S. uberis, *S. agalactiae* lub *S. aureus***

PL 246485 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są sposób i kompozycja diagnostyczna do wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus*.

Zapalenie wymion u krów (mastitis) stanowi istotny problem weterynaryjny, generując milionowe straty finansowe wśród hodowców bydła [1]. Szacuje się, że w krajach uznawanych za liderów w produkcji mleka, mastitis diagnozowane jest nawet u 20% krów [2]. Z kolei straty ekonomiczne generowane w następstwie występowania klinicznej formy mastitis mogą dla każdej farmy wynosić nawet 76 000 USD miesięcznie [3]. Niniejsze straty powodowane są przede wszystkim zmniejszeniem ilości pozyskiwanego mleka, pogorszeniem jego jakości, ale także mogą wynikać z konieczności odizolowania chorych zwierząt na czas leczenia, w którym to zwierzęta nie tylko nie produkują mleka, ale także wymagają leczenia [1].

Wśród najczęstszych patogenów wywołujących mastitis wymienia się bakterie, takie jak: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ale także grzyby i glony [4, 5].

Mastitis może przyjmować formę subklinicznej, klinicznej bądź chronicznej infekcji. Forma ta zależy między innymi od czynnika etiologicznego, wieku, rasy, odporności zwierzęcia oraz statusu laktacyjnego. Najrzadziej opisywana jest forma chroniczna, ale prowadzi ona do trwałego zapalenia gruczołu mlekowego. Najbardziej niebezpieczna jest forma kliniczna, która rozpoznawana jest na podstawie widocznych i namacalnych objawów, takich jak: gorączka, obrzęk, ból i zaczerwienienie gruczołu mlekowego, ponadto zmniejszeniu ulega ilość produkowanego mleka, a także pojawiają się zmiany w jego wyglądzie. Z kolei forma subkliniczna generuje największe straty w przemyśle mleczarskim, a jest to związane z brakiem widocznych objawów [6, 7, 8].

Obecnie diagnostyka mastitis oparta jest głównie na szybkich testach umożliwiających oszacowanie liczby komórek somatycznych (ang. somatic cell count, SCC) w próbce badanego mleka krowiego. Metoda ta pozwala na szybkie uzyskanie diagnozy i, co najważniejsze – testy te możliwe są do wykonania bezpośrednio przy zwierzęciu. Jest to ich jeden z ważniejszych atutów, z uwagi na terenowy charakter pracy lekarzy weterynarii. Nie mniej jednak, kluczowym ograniczeniem tej metody jest brak możliwości identyfikacji czynnika etiologicznego. Brak wiedzy na temat patogenu wywołującego infekcję uniemożliwia z kolei wprowadzenie celowanej terapii antybiotykowej, a to może mieć wpływ na wzrost odsetka wielolekoopornych szczepów bakteryjnych, co stanowi rosnący problem na świecie.

Powszechnie stosowane metody umożliwiające identyfikację czynnika etiologicznego, tj. metody hodowlane, molekularne, serologiczne czy spektrometryczne (m.in. MALDI-ToF), są bardziej czasochłonne, wymagają specjalistycznego sprzętu i wykwalifikowanego personelu, a także niejednokrotnie uzyskane wyniki są trudne w jednoznacznej interpretacji. Jednakże, co najistotniejsze, nie mogą zostać przeprowadzone poza laboratorium, co znacznie ogranicza ich użyteczność w diagnostyce chorób bydła.

Zgłoszenie patentowe US2003073073A1 obejmuje multipleksowy test immunochromatograficzny (lateral flow assay, LFA) do diagnostyki mastitis zarówno u krów, jak i innych mlecznych zwierząt. Dla *Staphylococcus aureus* zastrzeżono m.in. białko fibronectin binding protein, którego wariant A zgłoszono w niniejszym wniosku. Dla pozostałych gatunków (*E. coli*, *S. agalactiae*, *S. uberis*) nie uwzględniono takich samych białek.

Zgłoszenie patentowe WO2019216775A1 opisuje również test LFA do multipleksowej diagnostyki mastitis, ale obejmuje inne antygeny.

Zgłoszenie patentowe US2005260695A1 obejmuje immunodiagnostykę mastitis w oparciu o m.in. laktoferynę.

Patent US9556281B2 dotyczy białka A (SpA) dla *Staphylococcus aureus*, jako antygeny wykorzystywanego w leczeniu i prewencji w infekcjach wywołanych przez tę bakterię.

Zgłoszenie patentowe CA2270404A1 obejmuje marker diagnostyczny dla *Streptococcus uberis* – lactoferrin binding protein, które nie znajduje się w puli białek objętych wnioskiem.

Z kolei zgłoszenie patentowe EP1532253A1 opisuje komponent szczepionki przeciwko *Streptococcus uberis* w postaci białek o masie ok. 22 kDa.

Celem wynalazku jest dostarczenie łatwego do przeprowadzenia, nawet w warunkach polowych, testu diagnostycznego który będzie jednocześnie spełniał następujące wymogi:

- będzie zapewniał możliwość jednoczesnej identyfikacji czterech gatunków bakterii, tj. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* i *Escherichia coli*, będących jednymi z najczęściej izolowanych gatunków wywołujących zapalenie wymion,
- czas wykonania testu i oczekiwania na wynik nie przekroczy 20 minut,
- test będzie zapewniał wysoką czułość i specyficzność, wynoszące co najmniej 80%,
- test będzie możliwy do wykonania terenowo, bezpośrednio przy zwierzęciu i przez osobę niewykwalifikowaną w zakresie diagnostyki/medycyny weterynaryjnej (np. hodowcę).

Nieoczekiwanie określony powyżej cel został osiągnięty w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus*, znamienny tym, że w próbce materiału biologicznego, zwłaszcza mleka, pobranego z wymienia testowanej krowy bada się obecność następujących antygenów:

- pochodzącego z *E. coli* białka ompA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 1:

MKKTAAIAVALAGFATVAQAAPKDNTWYTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHENQ
LGAGAFGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPIT
DDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGKNHDTGVSPVFAAGGVEYAITPEIATRLEYQWT
NNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVVAPAPAPAPEVQTKHFTLKSDVL
FNFNKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSERRA
QSVVDYLISKGIPADKISARGMGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKG
IKDVVTQPQA

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 5–13,

- pochodzącego z *S. uberis* białka EF-Tu o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 2:

MAKEKYDRSKPHVNIGTIGHVDHGKTTTLTAAITTVLARRLPTSVNQPKDYASIDAAP
EERERGITINTAHVEYETETRHYAHIDAPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVASTDG
PMPQTREHILLSRQVGKHLIVFMNKIDLVDDEELLELVEMEIRDLLSEYDFPGDDL
VIQGSALKALEGDSKYEDIIMELMKTADEYIPEPERDTPKPLLPVEDVFSITGRGTVA
SGRIDRGTVRVNDEIEIVGIKEETKKA VVTGVEMFRKQLDEGLAGDNV GILLRGVQR
DEIERGQVIAKPGSINPHTKFKGEVYILSKDEGGRHTPPFNRYRPFYFRTTDVTGSIE
LPAGTEMVMPGDNVTISVELIHPIAVEQGTTFISIREGGRTVGSIVSEIEA

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 14–24,

- pochodzącego z *S. agalactiae* białka ADA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 3:

MTQAVLKELAKAELHCHLDGSLSLPAIRKLANMADIILPSSDKELRKYVIAPAQTESL
VDYLKTFEFIRPLLQTKALRFAAYDVARQAALENVYIEIRFAPELSMDKGLTASDT
VLAVLEGLADAQKEFNIVARALVCGMRQSSHKTTKDIIKHIVDLAPKGLVGFDFA
EFSYPTDSLVDLIQEVKRSGYPMTHAGECGCAKHIADSLNLGIKRMGHVLTALTGQR
DLIKRFVEEDVVAEMCLTSNLQTKAASSIQSFPYQELYDAGGKITINTDNRTVSDTNL
TKEYSLFVTYFGTKIEDFLVFNQNAVKAFTSDSEKDTLLHKLQENYDSYLYK

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 25–32, oraz

- pochodzącego z *S. aureus* białka FnBPA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 4:

MKNSLRYGIRKHKLGAA SVFLGTMIVVGMGQDKEAAASEQNTTVEENGNSATENKS
KQTTTNNVNNIDETQTYSATSTEQPSNATQVTAEAAPQAVEAPQTSQAPQKVQSTNV
ETVKEEVVKEEVQPQVKETARSQENSGDQRQVDLTPKKVTQNQGTEPQVEVAQPR
VSESKPRVTRSTDVAEAKDASEIKGTDVTSKVTVESGSIEAPQGNKVEPHAGQRVVL
KYKLKFEKGLHKDDYFDFTLSNNVNTHGVSTARKVPDIKNGTVVMATGQLLNGKI
RYTFTDYIDYKVNVTADLEINLFIDPKTVQSNQQIITSTLNDKETRTTLPIQYNPGVS
NSYANVNGSIETFDKGNNKFTHVAYIKPQNGHKSDSVSITGTLTQGSKANGNAPT
VYEVLDKAKELPESVYANISDSTMFKDVTQEMKDKLKVENNGSYKLDIEKLEKSYVI
HYDGEYLSGSDQVNFRTMHFGYPEQQYKYYYTHLGYQLTWDNGLVLYSNKAKGD
GTNGTITESNNMTFDEEYGNVITGQYDKNLVTTVEEEYDSSTLDIDYHTAIDGEGG

YVDGYETIEETDSSAIDIDYHTAVDSEAGHVGGYTESSEESNPIDFEESTHENS KHHA
DVVEYEEDTNPGGGQVTTESNLLEFDEESTKGIVTGAISDHTTVEDTKEYTTESNLIEL
VDELPEEHGQAQGPIEEITENNQHISHSGLGTENGHGNYGIVEEIEENSHVDIKSELGY
EGGQNIQNQSFEEDTEEDKPKYEQGGNIVDIDFDSVPQIQGQNKGDQSFEEDTEEDKP
KYEQGGNIVDIDFDSVPQIQGQNKGNQSFEEDTEKDKPKYEHGGNIIDIDFDSVPHIHG
FNKHTEIIEEDTNKDKPSYQFGGHNSVDFEEDTLPQVSGQNEGQQTIEEDTTPPIVPPT
PPTPEVPSEPETPTPTPEVPSEPETPTPTPTPEVPSEPETPTPTPEVPSEPETPTPTPTPT
EVPSEPETPTPTPEVPSEPETPTPPMPEIPAEPGKPVPPANEPPKKPSKPVEQKGKVVTP
VIEINEKVKAVKPAKTSQSKKTELPETGGEETTNGVLFGLLSIIGLVLLRRNKKNH
KA

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 33–51,
przy czym:

- stwierdzenie obecności antygeny pochodzącego z *E. coli* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *E. coli* wywołującym mastitis,
- stwierdzenie obecności antygeny pochodzącego z *S. uberis* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *S. uberis* wywołującym mastitis,
- stwierdzenie obecności antygeny pochodzącego z *S. agalactiae* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *S. agalactiae* wywołującym mastitis,

natomiast

- stwierdzenie obecności antygeny pochodzącego z *S. aureus* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *S. aureus* wywołującym mastitis.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompozycja diagnostyczna do wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus*, znamieny tym, że zawiera odczynniki, zwłaszcza przeciwciała, nadające się do wykrywania obecności następujących antygenów:

- pochodzącego z *E. coli* białka ompA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 1:

MKKTAAIAVALAGFATVAQAAPKDNTWYTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHENQ
LGAGAFGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPIT
DDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGKNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQWT
NNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVVAPAPAPAPEVQTKHFTLKSVDL
FNFNKATLKPGEQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSERRA
QSVVDYLISKGIPADKISARGMGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKG
IKDVVTQPQA

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 5–13,

- pochodzącego z *S. uberis* białka EF-Tu o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 2:

MAKEKYDRSKPHVNIGTIGHVDHGKTTLTAAITTVLARRLPTSVNQPKDYASIDAAP
EERERGITINTAHVEYETETRHIAHIDAPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVASTDG
PMPQTREHILLSRQVGVKHLIVFMNKIDLVDDEELLELVEMEIRDLLSEYDFPGDDL
VIQGSALKALEGDSKYEDIIMELMKTADEYIPEPERDTDKPLLLPVEDVFSITGRGTVA
SGRIDRGTVRVNDEIEIVGIKEETKKAVVTGVEMFRKQLDEGLAGDNVIGILLRGVQR
DEIERGQVIAKPGSINPHTKFKGEVYILSKDEGGRHTPFFNNYRPQFYFRTTDVTGSIE
LPAGTEMVMPGDNVTISVELIHPIAVEQGTTFISIREGGRTVGSIVSEIEA

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 14–24,

- pochodzącego z *S. agalactiae* białka ADA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 3:

MTQAVLKELAKAELHCHLDGSLSLPAIRKLANMADIILPSSDKELRKYVIAPAQTESL
VDYLKTFEFIRPLLQTKEALRFAAYDVARQAALENVIIYIEIRFAPELSMDKGLTASDT
VLAVLEGLADAQKEFNIVARALVCGMRQSSHKTTKDIKHIVDLAPKGLVGFDFAFD
EFSYPTDSLVDLIQEVKRSGYPMTHAGECGCAKHIADSLNLGIKRMGHVTAALTGQR
DLIKRFVEEDVVAEMCLTSNLQTKAASSIQSFPYQELYDAGGKITINTDNRTVSDTNL
TKEYSLFVTYFGTKIEDFLVFNQNAVKAFTSDSEKDTLLHKLQENYDSYK

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 25–32, oraz

- pochodzącego z *S. aureus* białka FnBPA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 4:

MKNSLRYGIRKHKLGAAASVFLGTMIVVGMGQDKEAAASEQNTTVEENGNSATENKS
KQTTTNNVNNIDETQTYSATSTEQPSNATQVTAEEAAPQAVEAPQTSQAPQKVQSTNV
ETVKEEVVKEEVQPVKETARSQENSGDQRQVDLTPKKVTQNQGTEPQVEVAQPRT
VSESKPRVTRSTDVAEAKDASEIKGTDVTSKVTVESGSIEAPQGNKVEPHAGQRVVL
KYKLFKEKGLHKDDYFDFTLSNNVNTHGVTARKVPDIKNGTVVMATGQLLNGKI
RYTFTDYIDYKVNVTADLEINLFIDPKTVOSNGOOHTSTLNDKETRTTLPIOYNPGVS
NSYANVNGSIETFDKGNNKFTHVAYIKPQNGHKSDSVSITGTLTQGSKANGNAPTVM
VYEVKDAKELPESVYANISDSTMFKDVTQEMKDKLKVENNGSYKLDIEKLEKSYVI
HYDGEYLSGSDQVNFRTMFMGYPEQQYKYYYTHLGYQLTWDNGLVLYSNKAKGD
GTNGTITESNNMTFDEEYGNVITGQYDKNLVTTVEEEYDSSTLDIDYHTAIDGEGG
YVDGYIETIETDSSAIDIDYIITAVIDSEAGIIVGGYTESSEESNPIDFEESTIENSKIHA
DVVEYEEDTNPGGGQVTTESNLLFDEESTKGIVTGAISDHTTVEDTKEYTTESNLIEL
VDELPEEHGQAQGPTEEITENNQHISHSGLGTENGHGNYGIVEEIEENSHVDIKSELGY
EGGQNIGNQSFEEDTEEDKPKYEQGGNIVDIDFDSVPQIQGQNKGDQSFEEDTEEDKP
KYEQGGNIVDIDFDSVPQIQGQNKGNQSFEEDTEEDKPKYEHGGNIIDIDFDSVPHIHG
FNKHTETIIEEDTNKDKPSYQFGGHNSVDFEEDTLPQVSGQNEGQQTIEEDTTPPIVPPT
PPTPEVPSEPETPTPTPEVPSEPETPTPTPTPEVPSEPETPTPTPTPEVPSEPETPTPTPTPT
EVPSEPETPTPTPEVPSEPETPTPPMPEIPAEPGKPVPPANEPPKKPSKPVQEGKVVT
VIEINEKVKAVKPAKTSQSKKTELPEGTGEETTNGVLFGLLSIIGLVLLRRNKKNH
KA

lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 33–51.

Korzystnie, kompozycja diagnostyczna według wynalazku charakteryzuje się tym, że zawiera specyficzne wobec określonych powyżej antygenów przeciwciała monoklonalne lub poliklonalne.

Korzystnie, kompozycja diagnostyczna według wynalazku zawiera znakowane przeciwciała.
Szczegółowy opis wynalazku

Jednym z aspektów wynalazku jest multipleksowy test immunodiagnostyczny do wykrywania antygenów bakteryjnych reprezentatywnych dla 4 gatunków bakterii: *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* i *S. aureus* będących jednymi z najczęstszych czynników etiologicznych zapalenia wymion (mastitis) u krów.

Zgodnie z wynalazkiem zidentyfikowano łącznie 14 immunogennych białek, które wykazują antygenowy potencjał rozumiany jako specyficzność gatunkowa i immunoreaktywność, a także które związane są z powierzchnią komórki bakteryjnej. Właściwości te udało się potwierdzić zarówno przy pomocy analiz bioinformatycznych, jak i eksperymentalnych badań laboratoryjnych wykorzystujących metodę SDS-PAGE i immunoblottingu z zastosowaniem przeciwciał pochodzących od zwierząt zainfekowanych jedną z czterech wymienionych bakterii, jak również pochodzących od zdrowych krów (kontrola ujemna, zwierzęta bez mastitis). W eksperymentach wykorzystano także szczepy pochodzące od zwierząt z mastitis o etiologii innej niż *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* czy *S. aureus*, celem wykluczenia reakcji krzyżowych.

W przykładowej realizacji, wybrane zgodnie z wynalazkiem białka (ompA dla *E. coli*, EF-Tu dla *S. uberis*, ADA dla *S. agalactiae*, FnBPA dla *S. aureus*) oraz przeciwciała monoklonalne skierowane

przeciwko nim zostały wykorzystane do opracowania szybkiego multipleksowego testu immunochromatograficznego, przy pomocy którego wykrywane mogą być bakterie obecne w mleku pozyskanym od krów z mastitis.

W korzystnej realizacji wynalazku antygeny zidentyfikowane przez twórców wynalazku wykrywane są poprzez monoklonalne przeciwciała stanowiące kluczowy komponent testu immunochromatograficznego (ang. *lateral flow assay*, LFA).

W omówionej poniżej przykładowej realizacji wynalazku ma on postać kasetkowego testu immunochromatograficznego (ang. *lateral flow assay*, LFA).

Nieoczekiwanie test oparty na wskazanych zgodnie z wynalazkiem antygenach zapewnia wysoką czułość i specyficzność, wynoszące co najmniej 80%.

Przykład 1. Identyfikacja antygenów nadających się do wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus*

Identyfikacja antygenów charakterystycznych dla patogennych gatunków *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* oraz *Streptococcus agalactiae* wywołujących mastitis u krów

Przygotowanie próbek

22 próbki mleka (50 ml) pobrano z zakażonych ćwiartek wymion krów, u których zidentyfikowano kliniczne objawy mastitis, takie jak: obrzęk, podniesiona temperatura, stwardnienie, zaczerwienienie oraz bolesność wymienia, zmiany w konsystencji mleka (wodnistość, obecność ropy czy skrzepów). Próbkę pobierano w ramach rutynowej procedury pobierania mleka przez lekarzy weterynarii z Przychodni Weterynaryjnej „Omnivet” w Orzeszu oraz Przychodni Weterynaryjnej „Egida” w Wiznej. Ponadto, pobrano 12 próbek mleka od zdrowych zwierząt, które stanowiły kontrolę ujemną. Dodatkowo próbka mleka pochodząca od krowy z zakażeniem wywołanym przez *Streptococcus dysgalactiae* stanowiła kontrolę mającą na celu wykluczenie reakcji krzyżowej pomiędzy badanymi izolatami należącymi do rodzaju *Streptococcus*.

19 próbek krwi (20 ml), w celu pozyskania surowicy, pobierano poprzez pojedyncze wkłucie do żyły szyjnej podczas rutynowych badań diagnostycznych prowadzących do wykrycia mastitis (próbka dodatnia). Ponadto 12 próbek krwi pochodzących od zdrowych zwierząt (kontrola ujemna), pobranych zostało przez lekarzy weterynarii przy okazji wykonania rutynowych badań biochemicznych.

Mleko i surowice przechowywano w temp. -80°C.

Hodowla bakterii i ich identyfikacja

100 µl każdej próbki mleka hodowano na podłożu Columbia z dodatkiem krwi baraniej (Difco) w warunkach tlenowych przez 24 godziny w 37°C. Następnie próbki zidentyfikowane wstępnie jako *E. coli*, celem potwierdzenia gatunku, hodowano na podłożu McConkey (oxid) w warunkach tlenowych przez 24 godziny w 37°C. Ponadto, kolonie o morfologii odpowiadającej jednemu z czterech poszukiwanych gatunków poddawano dalszym analizom celem potwierdzenia gatunku. Identyfikacja obejmowała hodowlę na podłożu Granada Agar (bioMérieux) dedykowanemu detekcji β-hemolizującym szczepom *Streptococcus agalactiae*, na podłożu chromogennym CHROMagar™ Mastitis GP (CHROMagar™) służącemu rozróżnianiu najczęstszych Gram-dodatnim gatunków wywołujących mastitis u krów. Identyfikację prowadzono także w oparciu o test CAMP, test na katalazę, test API i metodę MALDI-ToF.

Izolacja i detekcja białek

Izolację białek bakteryjnych prowadzono w oparciu o zmodyfikowaną procedurę Park i wsp. [9], która opracowana została na podstawie protokołu opisanego przez Fanga i Olivera [10]. Modyfikacje obejmowały m.in. hodowlę na płynnym podłożu tryptonowo-sojowym (ang. Tryptic soy broth, TSB; Becton-Dickinson) przez 24 godziny w 37°C. Po zakończeniu hodowli zawiesinę bakteryjną wirowano (3000 rpm przez 30 min), po czym nadsącz usuwano, a pelet bakteryjny zawieszano w 3 ml soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (ang. phosphate buffered saline, PBS; Thermo Fisher) i wirowano przez 20 minut (3300 rpm). Po trzykrotnym powtórzeniu procedury dla każdej próbki określano mokrą masę bakterii i do każdego 30 mg mokrej masy komórkowej dodawano po 100 µl 0,2% roztworu dodecylsulfanu sodu (ang. sodium dodecyl sulfate, SDS; Sigma Aldrich), po czym próbki inkubowano przez 1 godzinę w 43°C. Następnie materiał wirowano (20 min, 3300 rpm), a nadsącz zawierający wyizolowane białka zbierano i przenoszono do jałowej probówki typu eppendorf. Pozostały po wirowaniu osad wysiewano na podłoże Columbia z dodatkiem krwi baraniej (difco) i inkubowano przez 18 godzin w 37°C w celu potwierdzenia izolacji jedynie białek związanych z powierzchnią komórki bakteryjnej. Stężenie białek badano przy zastosowaniu zestawu Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Następnie próbki rozporcjowano i przechowywano w -20°C do dalszych badań.

W celu rozdzielania mieszaniny białek, po 10 μ l każdej próbki mieszano z buforem Laemmli'ego, redukowano przez 5 min w temp. 100°C w bloku grzejmym, wirowano 10 min w 13 000 g i наносono na gradientowy żel poliakrylamidowy o stężeniu 4–20% [11]. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) prowadzono początkowo przez 20 minut przy napięciu 80 V, po czym kontynuowano przez 40 minut przy 120 V. Po zakończeniu SDS-PAGE żel trzykrotnie przepłukiwano w dejonizowanej wodzie (dH_2O), po czym wybarwiano w Coomassie Brilliant Blue (BIO-RAD) lub bezpośrednio poddawano transferowi na membranę z polifluorku winylidenu (ang. polyvinylidene difluoride membrane, PVDF; Millipore) przez 90 minut przy napięciu 135 V.

Następnie membrany blokowano w 1% roztworze surowiczej albuminy wołowej (ang. bovine serum albumin, BSA; Thermo Fisher) w PBS z dodatkiem Tween-20 (PBS-T, Thermo Fisher) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem.

Następnie membrany 3-krotnie przepłukiwano przez 5 minut w PBS-T, po czym inkubowano przez 2 godziny w 37°C z roztworem badanej surowicy w rozcieńczeniu 1:1000 i ponownie płukano w PBS-T (3 x 5 min).

Inkubację z baraniami anty-bydlęcymi II-rzędowymi przeciwciałami skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (Novusbio) w rozcieńczeniu 1:10 000 prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, po czym membrany płukano 3-krotnie przez 5 min w PBST. Białkowe prążki wizualizowano poprzez wywołanie chemiluminescencji przy zastosowaniu Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) i jej pomiar przy użyciu aparatu C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR).

Następnie 13 prążków białkowych (3 dla *E. coli*, 4 dla *S. uberis*, 6 dla *S. agalactiae*), które występowały wśród wszystkich szczepów danego gatunku, ale ich immunoreaktywność dla pozostałych gatunków nie była obecna (lub była bardzo słaba) wycięto z żelu i poddano dalszym analizom prowadzącym do identyfikacji białek.

Identyfikacja białek

W celu identyfikacji białek wyciętych z żelu elektroforetycznego prążki odbarwiono metanolem, poddano redukcji i alkilacji przy użyciu roztworów ditiotreitolu i jodoacetamidu. Następnie fragmenty żelu trawiono w roztworze trypsyny w 50 mM buforze węglanowym (Promega, Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Technical Bulletin) w 37°C przez noc. Uzyskane w ten sposób peptydy ekstrahowano z żelu przy pomocy roztworu składającego się z wody, acetonitrylu i kwasu trifluorooctowego poprzez trzykrotną elucję (v:v 45:50:5). Mieszaninę peptydów oczyszczano i zagęszczano przy użyciu końcówek C18 Zip-TIP zgodnie z instrukcją producenta (Merck Chemicals, Billerica, MA, USA, PR 02358, Technical Note).

W celu identyfikacji białek, oczyszczone mieszaniny peptydów badanych wraz z roztworem peptydów wzorcowych nałożono na płytkę Anchor Chip MALDI (Bruker), na które następnie nałożono 1 μ l macierzy kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego (HCCA, Bruker).

Widma masowe analizowanych próbek uzyskano w zakresie 700–4000 m/z przy pomocy spektrometru Ultraflex™ MALDI TOF/TOF (Bruker) wraz z oprogramowaniem flexControl 3.3 (Bruker). Uzyskane spektra wygładzono, a linię odcięcia skorygowano. Lista pików wygenerowana w programie flexAnalysis 3.0 (Bruker) dla stosunku sygnału do szumu większego niż 3 została przeniesiona do BioTools 3.2 (Bruker) i porównana z oprogramowaniem Mascot 2.2 (Matrix Science) z wykorzystaniem bazy danych Swiss-Prot (www.uniprot.org) ograniczonej do taksonomii „bakterii” z błędem maksymalnym 0,3 Da oraz karbamidometylacji cysteiny, jako obowiązkowej modyfikacji i trypsyny jako enzymu trawiącego.

Widma porównywano ze względu na podobieństwo do tzw. peptydowego odcisku palca, charakterystycznego dla poszczególnych białek. W tym przypadku liczbę nakładających się sygnałów peptydowych utworzonych po trawieniu zastosowano do porównania danych z tymi obecnymi w bazie danych białkowych z adnotacjami. Wyniki uzyskane w Mascot z wartością większą niż 61 uznano za istotne statystycznie ($p \leq 0,05$). Pozostałe widma jonów fragmentarycznych wybranych peptydów rejestrowano w trybie LIFT i połączono celem identyfikacji MALDI TOF/TOF. Interpretacji wyników dokonano w następujący sposób: wynik białka wynosił $-10 \cdot \log(P)$, gdzie P jest prawdopodobieństwem, że obserwowane dopasowanie jest zdarzeniem losowym. Im wyższa wartość punktowa, tym lepsza identyfikacja.

Analiza bioinformatyczna

W celu zbadania struktury, funkcji i immunogenności zidentyfikowanych białek wykonano szereg analiz bioinformatycznych uwzględniających predykcję lokalizacji w obrębie komórki, antygenowość, detekcję peptydów sygnałowych oraz klasycznych i nieklasycznych białek. Dodatkowo, wybrane białka

poddawano analizie identyfikacji liniowych epitopów limfocytów B, poszukiwaniu modelu PDB i identyfikacji konformacyjnych epitopów komórek B.

Subkomórkową lokalizację białek przewidywano za pomocą PsortB 3.0 oraz serwera Bologna Unified Subcellular Component Annotator (BUSCA) – z rozróżnieniem na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Lokalizacje subkomórkowe oznaczono adnotacją GO, przy czym zewnątrzkomórkowe jako GO:0005615, a cytoplazmatyczne jako GO:0005737.

Predykcji funkcji białek dokonano za pomocą serwerów PRED-LIPO (predykcja białek sygnałowych), SignalP (klasyczne białka), Secretome (nieklasyczne białka dla bakterii Gram-dodatnich) oraz PncsHub (nieklasyczne białka dla bakterii Gram-ujemnych). Białka klasyczne i nieklasyczne przewidziano z wartością ustawienia domyślnego odpowiednio 0,45 i 0,5.

W celu zidentyfikowania najbardziej antygenowych białek przeprowadzono predykcję *in silico* za pomocą oprogramowania VaxiJen. Przewidywanie antygenowe zostało skorygowane do wartości domyślnej 0,4, a białka z wynikiem $\geq 0,4$ uznano za białka antygenowe.

Epitopy komórek B dla białek antygenowych identyfikowano za pomocą Antibody Epitope Prediction w bazie danych IEDB. Konformacyjne epitopy komórek B identyfikowano w następujący sposób: dla każdej sekwencji białka zidentyfikowano matrycę PDB za pomocą SWISS-MODEL Workspace z uwzględnieniem identyfikatorów PDB. Następnie wybrano najlepszą matrycę (o wyższej identyczności), na podstawie której zbudowano odpowiedni model. Wybrane identyfikatory PDB zostały następnie wykorzystane do przewidywania liniowych i nieciągłych konformacyjnych epitopów komórek B za pomocą oprogramowania ellipro.

Wyniki

Identyfikacja gatunkowa bakterii

W puli badanych próbek mleka pozyskanych od krów ze zdiagnozowanym mastitis gatunek lub rodzaj czynnika etiologicznego potwierdzono dla wszystkich badanych izolatów. Najczęściej izolowano bakterie z rodzaju *Streptococcus* (n=15; 68,2%), następnie bakterie z gatunku *Escherichia coli* (n=4; 18,2%), *Enterococcus cecorum* (n=1; 4,5%), *Aerococcus viridans* (n=1; 4,5%) i *Enterobacter cloacae* (n=1; 4,5%).

Wśród rodzaju *Streptococcus* dominował gatunek *Streptococcus uberis*, który był obecny w 11 badanych próbkach (73%), *Streptococcus dysgalactiae* wykryto w dwóch próbkach (13%), a *Streptococcus agalactiae* był obecny tylko w jednej badanej próbce mleka (7%). Jeden szczep paciorkowca (7%) nie został zidentyfikowany na poziomie gatunku.

Na Fig. 1 przedstawiono odsetek szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka krów z rozpoznaniem zapalenia wymienia z podziałem na gatunki i/lub rodzaje.

Detekcja białek

Detekcję białek prowadzono dla trzech reprezentatywnych szczepów *Escherichia coli*, dla trzech szczepów *Streptococcus uberis* i jednego szczepu *Streptococcus agalactiae*.

Hodowla osadu pozostałego po izolacji białek wykazała wzrost bakterii dla każdego z badanych szczepów (ocena jakościowa), dlatego też założono, że procedura izolacji białek z wykorzystaniem SDS nie uszkodziła ściany komórkowej bakterii, a tym samym pozyskano jedynie białka związane ze ścianą komórkową badanych bakterii.

Na Fig. 2. przedstawiono przykładowe wyniki immunodetekcji białek reprezentatywnych dla *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* oraz *Streptococcus agalactiae* badanych w obecności surowic pochodzących od zakażonych zwierząt (EC-positive – surowice pochodzące od krów z mastitis o etiologii *Escherichia coli*; SU-positive – surowice pochodzące od krów z mastitis o etiologii *Streptococcus uberis*, GBS-positive – surowice pochodzące od krów z mastitis o etiologii *Streptococcus agalactiae* (ang. group B streptococcus; GBS) oraz od zdrowych zwierząt (C-).

Z puli ok. 16 immunoreaktywnych w obecności spulowanych surowic EC-dodatnich (surowice pozyskane od krów z mastitis o etiologii *E. coli*: nr 1752, nr 0653/1) białek reprezentatywnych dla *Escherichia coli* trzy, o następujących masach: ok. 5 kDa (EC1), ok. 18 kDa (EC2), i ok. 35 kDa (EC3), poddano dalszym analizom (Fig. 2A).

Z kolei z puli ok. 14 białek *Streptococcus uberis* specyficznie reagujących z surowicami SU-dodatnimi (surowice pozyskane od krów z mastitis o etiologii *S. uberis*: nr 0653, nr 5754, nr 7939) pięć prążków o masach: ok. 19 kDa (SU4), ok. 30 kDa (SU3), ok. 41 kDa (SU5), ok. 48 kDa (SU1), ok. 100 kDa (SU2) (Fig. 2B) wycięto i poddano sekwencjonowaniu.

Najmniejszą immunoreaktywność białek odnotowano dla gatunku *Streptococcus agalactiae* (ang. group B Streptococcus, GBS). Przyczyną tego zjawiska może być mniejsza liczba surowic ($n=1$, nr 1917) w porównaniu z pozostałymi gatunkami objętymi badaniami. Ostatecznie do dalszych analiz wybrano 6 białek o następujących masach: ok. 29 kDa (GBS1), ok. 48 kDa (GBS2), ok. 60 kDa (GBS3), ok. 80 kDa (GBS8), ok. 85 kDa (GBS4) i ok. 100 kDa (GBS7) (Fig. 2C).

Co warto podkreślić, wymienione powyżej białka nie wykazywały immunoreaktywności (lub reaktywność ta była bardzo niska) wobec surowic pochodzących od krów bez mastitis (surowice ujemne), co wskazuje na ich wysoką specyficzność. Fakt jakiegokolwiek reaktywności może być następstwem wcześniejszego kontaktu z badanymi patogenami. Co więcej, dla większości prążków białkowych nie zaobserwowano również reakcji krzyżowych pomiędzy badanymi paciorkowcowymi surowicami (*S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*).

Na Fig. 3 przedstawiono przykładowe wyniki badania reakcji krzyżowych pomiędzy *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* oraz *Streptococcus dysgalactiae* w obecności surowic pozyskanych od krów ze zdiagnozowanym mastitis o etiologii *Streptococcus agalactiae* (GBS-positive) oraz spulowanych surowic pozyskanych od krów z mastitis o etiologii *Streptococcus uberis* (SU-positive).

Identyfikacja białek

Uzyskane spektra masowe białek porównane zostały z danymi dostępnymi w bazie danych Swiss-Prot. W rezultacie zidentyfikowano 13 białek dla progu istotności $p \leq 0,05$, podczas gdy sześć zidentyfikowano dla *S. agalactiae*: aspartate carboxyltransferase (GBS 1), elongation factor Tu (GBS 2), 60 kDa chaperonin (GBS 3), elongation factor G (GBS 4), galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA (GBS 7) oraz adenosine deaminase (GBS 8), cztery dla *S. uberis*: elongation factor Tu (SU 1), tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG (SU 3), GTPase Obg (SU 4), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (SU 5), a 3 dla *E. coli*, molybdenum cofactor biosynthesis protein B (EC 1), aldehyde reductase YahK (EC 2) oraz outer membrane protein A (EC 3). Różnice w masach molekularnych pomiędzy masą zidentyfikowanych białek a masą określoną w SDS-PAGE na podstawie porównania z masą markeru białkowego może wynikać z obecności wielu form białek, ich modyfikacji lub ich częściowego rozkładu.

Analiza bioinformatyczna

13 opisanych powyżej białek poddano analizie bioinformatycznej, której celem było określenie ich immunogenności i funkcjonalności. W pierwszym etapie analizy białka poddano klasyfikacji na podstawie ich lokalizacji w obrębie komórki. W rezultacie 12 białek zaklasyfikowano jako cytoplazmatyczne (GO: 000573), podczas gdy jedno (EC3) zlokalizowane było na błonie zewnętrznej (GO: 0019867) elementów subkomórkowych.

W następnym etapie dokonano podziału na klasyczne i nieklasyczne białka. Wykazano, że 9 białek: EC3, GBS 1, GBS 2, GBS 3, GBS 4, GBS 7, SU 1, SU 3, SU 5 zidentyfikowano jako białka nieklasyczne (secretomic proteins). Ponadto białka klasyfikowano również pod względem ich antygenowego potencjału i wykazano, że 12 spośród 13 białek oznaczonych zostało jako antygeny. Detekcja peptydów sygnałowych wykazała, że tylko jedno białko, EC3, posiadało peptyd sygnałowy (Sec signal).

Struktury każdego z 13 białek analizowano w celu identyfikacji epitopów komórek B. W rezultacie ich obecność wykazano dla wszystkich białek, a ich liczba oscylowała w granicach 1–22. To z kolei umożliwiło wykonanie dalszych analiz obejmujących identyfikację konformacyjnych epitopów dla wszystkich badanych białek. Najpierw zidentyfikowano najbardziej zbliżoną strukturę białka PDB (wzorcowego) i na jego podstawie zbudowano model białka badanego. Identyczność matrycy dla całej puli analizowanych białek mieściła się w zakresie 35–100%. Skonstruowane w ten sposób modele posłużyły do identyfikacji liniowych i nieciągłych epitopów konformacyjnych. W rezultacie wytypowano 2–10 epitopów liniowych i 3–8 epitopów nieciągłych. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Identyfikacja antygenów charakterystycznych dla patogennych szczepów *Staphylococcus aureus* wywołujących mastitis u krów

Badaniem objęto 3 reprezentatywne szczepy *Staphylococcus aureus* wyizolowane z mleka krów ze zdiagnozowanym mastitis oraz 6 próbek surowicy pochodzących od krów ze zdiagnozowanym mastitis o etiologii *S. aureus*. Krew do badań pobrano poprzez jednorazowe wkłucie do żyły szyjnej w ramach rutynowej procedury pobierania krwi do badań diagnostycznych w kierunku mastitis. Zarówno szczepy bakteryjne, jak i próbki surowicy pochodziły z kolekcji własnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Dodatkowo, 12 próbek surowicy stanowiło pulę kontroli ujemnych i pozyskane zostały przez lekarzy weterynarii z Przychodni Weterynaryjnej Omniwet w Orzeszu w ramach rutynowych badań mających na celu określenie podstawowych parametrów biochemicznych.

Wszystkie izolaty przechowywano w Microbank™ Preservation System (BioMaxima S.A., Poland) w -80°C do dalszych badań. Próbkę surowicy przechowywano w takich samych warunkach temperaturowych.

Metody

Analiza bioinformatyczna

W celu wytypowania wysoce specyficznych białek powierzchniowych reprezentatywnych dla *Staphylococcus aureus* potencjalnie występujących w mleku krowim, które mogłyby stanowić specyficzne biomarkery w innowacyjnym teście immunochromatograficznym do diagnozowania mastitis, wykonano następujące analizy.

W pierwszym etapie pobrano sekwencje aminokwasowe z baz danych Esembl Bacteria i UniProt. W związku z bardzo dużą ilością danych sekwencje połączono w pojedyncze, reprezentatywne dla poszczególnych gatunków, pliki. Następnie sekwencje te podzielono na dwie grupy: „dodatnie” (Gram-dodatnie) i „ujemne” (Gram-ujemne). W następnym etapie sekwencje aminokwasowe poddano klastrowaniu przy pomocy programu CD-HIT. Analiz dokonano dla progów identyczności równych 70%, 80% i 90%. Z kolei potencjalnie powierzchniowe białka przewidywano przy użyciu programu PSORTb, który umożliwił określenie lokalizacji białek w obrębie komórki bakteryjnej. Badane sekwencje podzielono na: „Cellwall” (związane ze ścianą komórkową), „CytoplasmicMembrane” (obecne w cytoplazmie), „Extracellular” (białka zewnątrzkomórkowe) oraz „Unknown” (nieznane). Do dalszej analizy wybrano tylko sekwencje zidentyfikowane jako „CellWall”. W następnym etapie połączono dane uzyskane w wyniku analiz prowadzonych w programach PSORTb oraz CD-HIT. Sekwencje aminokwasowe, reprezentatywne dla powierzchniowych białek *Staphylococcus aureus*, które zakwalifikowane zostały do wspólnego klastra z sekwencjami reprezentatywnymi dla innych gatunków Gram-dodatnich wykluczono z dalszych analiz. Pozostałe białka poddano analizom w bazie NCBI BLAST, których celem było porównanie ich z referencyjnymi sekwencjami reprezentatywnymi dla łącznie 18 gatunków bakterii, wirusów i grzybów, mogących potencjalnie występować w mleku krowim. Do dalszej analizy wybrano tylko te sekwencje, które nie identyfikowały się w żaden sposób z sekwencjami referencyjnymi. W ostatnim etapie analizy bioinformatycznej sekwencje aminokwasowe, które nie zostały wykluczone w poprzednich krokach zostały poddane analizie w bazie danych BLASTp pod kątem wykrywania tzw. sekwencji białkowych non-redundant (NR). Finalnie wybrano tylko te sekwencje, które były unikalne dla badanych gatunków bakterii (przy maksymalnym progu identyczności 75%).

Hodowla bakterii

W celu ożywienia zbankowanych szczepów *S. aureus*, 100 µl z każdej próbki hodowano na podłożu Columbia z dodatkiem krwi baraniej (Difco) w warunkach tlenowych przez 24 godziny w 37°C. Po zakończeniu hodowli do dalszych badań pobierano pojedynczą kolonię *S. aureus* i hodowano w 9 ml płynnego podłoża tryptonowo-sojowego w warunkach tlenowych przez 24 godziny w 37°C.

Izolacja DNA

Izolacja baterijnego DNA prowadzona była przy użyciu komercyjnego zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology) zgodnie z procedurą producenta zmodyfikowaną o dodanie 0,4 U/µl lizostafiny (A&A Biotechnology). Stężenie i czystość wyizolowanego DNA oceniano przy pomocy aparatu NanoDrop (Thermo Scientific). DNA przechowywano w -20°C do dalszych badań.

Detekcja genu *fnbA*

Reakcja PCR mająca na celu detekcję genu *fnbA* kodującego białko A wiążące fibronektynę (ang. fibronectin binding protein A, FnBPA) przeprowadzona została w oparciu o procedurę opracowaną przez Tristan i wsp. [12] z uwzględnieniem drobnych modyfikacji. Amplifikację genu *fnbA* prowadzono przy użyciu pary starterów o następujących sekwencjach: *fnbA*-F (CATAAATTGGGAGCAGCATCA) i *fnbA*-R (ATCAGCAGCTGAATTCCCAT) (Genomed) w stężeniu 0,1 µM (1,25 µl każdego ze starterów na próbkę), 12,5 µl komercyjnej mieszaniny PCR Mix Plus Kit (A&A Biotechnology) oraz 7,5 µl wody wolnej od RNaz (A&A Biotechnology) oraz 2,5 µl bakteryjnego DNA. Reakcję PCR prowadzono w aparacie T100 Thermal Cycler (BIO-RAD) według następującego programu: wstępna denaturacja (5 min, 94°C), 30 cykli amplifikacji z uwzględnieniem etapów denaturacji (1 min, 94°C), przyłączania starterów (1 min, 55°C) i syntezy nici DNA (1 min, 72°C). Reakcję kończył etap 10 minutowej inkubacji w 72°C.

Produkt amplifikacji o wielkości 128 bp wizualizowano w następstwie 60-minutowej elektroforezy w 1% żelu agarozowym (Prona).

Izolacja białek

W celu optymalizacji procedury izolacji białek powierzchniowych dla *Staphylococcus aureus* porównano dwie metody.

Pierwsza metoda szczegółowo opisana została w sekcji „**Izolacja i detekcja białek**”.

Natomiast, zgodnie z drugą procedurą opisaną przez Banner i wsp. [13], bakterie hodowano na płynnym podłożu TSB w warunkach tlenowych przez 18 godzin w 37°C, po czym stężenie zawiesiny bakteryjnej doprowadzano do stężenia równego 3.3 McFarland w PBS (gibco). Bakterie dwukrotnie płukano i wirowano (4000 x g, 3 min). Następnie supernatant usuwano, a osad zawieszano w 150 µl roztworu PBS z dodatkiem 12 µl lizostafiny (A&A Biotechnology) i 1 mM inhibitora proteaz PMSF (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride; BIORAD) i inkubowano przez 30 min w 37°C z wytrząsaniem. Następnie materiał wirowano (4000 x g, 20 min, 4°C), a czym nadsącz zbierano.

Stężenie białek określano przy zastosowaniu zestawu Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Następnie próbki porcjowano i przechowywano w -20°C do dalszych badań.

SDS-PAGE i immunoblotting

10 µl mieszaniny białek powierzchniowych poddano rozdziałowi zgodnie z procedurą Laemmli'ego [11]. Po 5 minutowej redukcji w 100°C próbki wirowano przez 15 minut. SDS-PAGE prowadzono przy stałym natężeniu 25 mA. Następnie żele płukano trzykrotnie w dejonizowanej wodzie i barwiono w Coomassie Brilliant Blue (BIO-RAD), zgodnie z procedurą producenta, lub bezpośrednio poddawano transferowi na membranę PVDF, który prowadzono przez 90 minut przy napięciu 135 V.

Membrany blokowano w 1% roztworze BSA (Sigma-Aldrich) w PBS-T (Thermo Fisher) w 4°C przez noc. Po trzykrotnym przepłukaniu w PBS-T przez 5 minut, membrany inkubowano z badanymi próbkami surowicy (SA1, SA3, SA5, SA13, SA29, SA31) rozcieńczonymi w PBS-T przez 2 godziny w 37°C w stężeniu 1:1000, po czym zostały przepłukane ponownie (3 x 5 min). Inkubację z baraniami anty-krowimi drugorzędowymi przeciwciałami IgG skoniugowanymi z peroksydazą chruzanową rozcieńczoną w PBS-T w stężeniu 1:10 000 prowadzono przez 1 godzinę w 22°C. Następnie membrany płukano 3-krotnie przez 5 minut w PBS-T i poddawano chemiluminescencji, którą wywoływano w aparacie ChemiDoc Imaging System (BIO-RAD) przy użyciu Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific).

Wyniki

Analiza bioinformatyczna

Analizie bioinformatycznej poddano łącznie 515 gatunków i 93 800 000 sekwencji aminokwasowych zebranych za pomocą programów Ensembl Bacteria i UniProt, spośród których 292 gatunki i 46 180 426 sekwencji aminokwasowych zakwalifikowano do grupy „Gram-dodatnich”. Przy pomocy programu CD-HIT wygenerowano 545 500 klastrow odpowiadających bakteriom Gram-dodatnim na poziomie identyczności 70%. Z kolei program PSORTb umożliwił detekcję 101 białek reprezentatywnych dla *Staphylococcus aureus* zlokalizowanych na powierzchni komórki, spośród których 74 potencjalnie występują w mleku, co zostało przewidziane dzięki analizie przeprowadzonej w bazie NCBI BLAST. Finalnie zidentyfikowano 36 reprezentatywnych dla *Staphylococcus aureus* białek powierzchniowych, a białko wiążące fibrynogen (FnBPA) było jednym z nich.

Detekcja genu *fnbA*

W wyniku przeprowadzonej reakcji PCR obecność genu *fnbA* wykazano we wszystkich badanych szczepach klinicznych *Staphylococcus aureus*.

Na Fig. 4 przedstawiona została detekcja genu *fnbA* (128 bp). Legenda: M – marker, SA1, SA13, SA31 – badane szczepy *S. aureus*, C – kontrola negatywna.

SDS-PAGE i Immunoblotting

Analiza ilości, układu i jakości prążków uzyskanych dwoma metodami izolacji wykazała niewielką przewagę metody drugiej (z zastosowaniem lizostafiny), dlatego też ją wybrano do dalszych eksperymentów.

Detekcja białka o wielkości odpowiadającej FnBPA (ok. 120 kDa) oraz badanie immunoreaktywności w obecności surowic SA-dodatnich (surowice pochodzące od krów ze zdiagnozowanym mastitis o etiologii *S. aureus*) (K+) wraz z potwierdzeniem specyficzności w obecności surowic pochodzących

od krów zdrowych (K-) wykazała obecność specyficznego białka o masie odpowiadającej FnBPA wśród wszystkich badanych szczepów *Staphylococcus aureus*.

Na Fig. 5 przedstawiona została detekcja białka FnBPA dla *S. aureus* w obecności surowic SA-dodatnich (K+) wraz z potwierdzeniem ich specyficzności w obecności surowic pochodzących od zwierząt zdrowych (kontrola ujemna, K-).

W Tabeli 1 przedstawiono sekwencje aminokwasowe zidentyfikowanych zgodnie z wynalazkiem epitopów pochodzących ze zidentyfikowanych zgodnie z wynalazkiem antygenów białkowych charakterystycznych dla patogennych szczepów *Staphylococcus aureus* wywołujących mastitis u krów.

Przykład 2. Test diagnostyczny do wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus*

Zestaw diagnostyczny

W przykładowej realizacji kompozycji diagnostycznej według wynalazku bazujący na niej test diagnostyczny do wykrywania zapalenia mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus* składa się z następujących elementów:

ZEWNĘTRZNYCH:

- A) plastikowej obudowy
- B) okienka do nakładania próbki mleka

WEWNĘTRZNYCH:

- A) **podkładka do nakładania próbek** – paski z włókna celulozowego, o grubości 0,83 mm, wadze 291 g/m², szybkości przepływu 196 mL/min i retencji 18 µm, (np. C083 Cellulose Fiber Sample Pad Strips; nr kat: CFSP173000, Millipore);
- B) **podkładka zawierająca koniugat z przeciwciałami** – podkładka diagnostyczna z włókna szklanego w paskach o grubości 0,41 µm i wadze 0,75 g/m² (np. Glass Fiber Diagnostic Pad 10 mm x 300 mm strips 100 pk, nr kat: GFDX103000, Millipore);
- C) **membrana testowa**, na której znajdować się będą: pasek kontrolny i 4 paski testowe z immobilizowanymi przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi rozpoznającymi antygeny białkowe obecne w komórkach wykrywanych gatunków bakterii – laminowane karty o wymiarach 6 cm x 30,1 cm z membraną o przepływie bocznym HI-Flow™ Plus i podkładem o grubości 2 µm przyklejonym do powierzchni karty np. HI-Flow™ Plus HF075 Membrane Cards (nr kat: HF075MC100, Millipore) o wysokiej prędkości przepływu; HI-Flow™ Plus HF 120 Membrane Cards, (nr kat: HF120MC100, Millipore) o średniej prędkości przepływu; HI-Flow™ Plus HF180 Membrane Cards, (nr kat: HF180MC100, Millipore) o niskiej prędkości przepływu;
- D) **podkładka absorbująca niezwiązane reagenty** – paski z włókna celulozowego, o grubości 0,83 mm, wadze 291 g/m², szybkości przepływu 196 mL/min i retencji 18 µm, np. C083 Cellulose Fiber Sample Pad Strips, (nr kat: CFSP173000, Millipore).

Na Fig. 6 przedstawiono schemat budowy i działania testu immunochromatograficznego.

Sposób wykonania testu wraz z interpretacją:

1. Próbkę mleka, przy użyciu sterylnej pipetki umieszczona zostanie na początku odpowiednio oznaczonego paska (ang. *sample pad*)
2. W wyniku działania sił kapilarnych próbka badana będzie przemieszczała się w kierunku podkładki zawierającej koniugat przeciwciał ze złotem koloidalnym (ang. *conjugate pad*), gdzie dojdzie do ich połączenia (antygen-koniugat)
3. Kompleksy antygen-koniugat złota koloidalnego przez ok. 10–20 minut będą przemieszczały się przez pasek testowy (ang. *migration membrane*), na którym immobilizowane będą 4 rodzaje przeciwciał monoklonalnych (anty-ompA, anty-EF-Tu, anty-ADA, anty-FnBPA) specyficznymi rozpoznające jeden z czterech antygenów (ompA, EF-Tu, ADA i/lub FnBPA) (ang. *test line*). Odpowiednie przeciwciała monoklonalne mogą być pozyskane dowolną znaną metodą, przykładowo poprzez immunizację myszy białkami, które wyprodukowane zostały w *E. coli*. Każdemu badanemu antygenowi odpowiada jeden prążek. W przykładowej realizacji przeciwciała otrzymano przy zastosowaniu procedury opartej na następujących etapach: immunizacji, fuzji, produkcji przeciwciał i określeniu miana przeciwciał, zgodnie z procedurą opisaną przez Galfrè'a oraz Milsteina [14]. W zależności od białka, na podstawie którego będą różnicowane gatunki, prążek umiejscowiony będzie na różnej wysokości (Fig. 7).

Interpretacja:

Po połączeniu się kompleksu badanego antygeny z przeciwciałami, na membranie powstanie barwny prążek świadczący o wyniku dodatnim. Pojawienie się co najmniej dwóch prążków (testowego i kontrolnego) wskazywało będzie na wynik dodatni (zapalenie wymion o etiologii *S. aureus* lub *S. agalactiae* lub *S. uberis*, lub *E. coli*), podczas gdy jeden (kontrolny) będzie wskazywał na wynik ujemny badania przeprowadzonego poprawnie. Brak jakiegokolwiek prążka lub obecność jedynie prążka testowego będzie świadczył o niepoprawnie przeprowadzonym teście i wymagał będzie powtórzenia całej procedury. Interpretacja testu będzie szybka, jednoznaczna i możliwa do dokonania zarówno przez lekarza weterynarii, jak i przez osobę odpowiedzialną za monitorowanie stanu zdrowia zwierząt w danym stadzie.

Na Fig. 7 przedstawiono schemat testu immunochromatograficznego w odmianie multipleks do jednoczesnej identyfikacji *Staphylococcus aureus* (SA), *Escherichia coli* (EC), *Streptococcus agalactiae* (GBS) oraz *Streptococcus uberis* (SU). Legenda: A – test dodatni pod względem każdego z badanych gatunków, B – test dodatni w kierunku *Streptococcus uberis*, C – prążek potwierdzający prawidłowe działania testu (źródło: własne).

Tabela 1. Lista epitopów dla wybranych antygenów reprezentatywnych dla *E. coli* (ompA), *S. uberis* (EF-Tu), *S. agalactiae* (ADA) i *S. aureus* (FnBPA).

Lp.	Sekwencja	Długość (liczba aminokwasów)
Białko ompA		
5.	³⁶ WSQYHDTGFINNNGPTHENQLGAG ⁵⁹	24
6.	⁷⁶ YDWLGRMPYKGSVENGAY ⁹³	18
7.	¹⁰⁵ GYPITD ¹¹⁰	6
8.	¹²⁶ DTKSNVYGKHNHDTGVSP ¹⁴²	17
9.	¹⁵⁵ EIATRLEYQWTNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQG EAAPVVAPAPAPAPEVQTKHF ²¹⁵	61
10.	²²² LFNFNKATL.KPF ²³³	12
11.	²⁶⁴ IGSDAYNQGLSER ²⁷⁶	13
12.	³⁰² ESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLA ³²⁵	24
13.	³³⁷ IKDVVT ³⁴²	6
Białko EF-Tu		
14.	⁴ EKYDRSK ¹⁰	7
15.	³⁷ ARRLPTSVNQPKDYASIDAAPEERER ⁶²	26
16.	¹⁴⁴ VDDEELLE ¹⁵²	8
17.	¹⁶⁵ DFPGD ¹⁶⁹	5
18.	¹⁸¹ ALEGDSKYEDI ¹⁹¹	11
19.	²⁰¹ EYIPEPERDT ²¹⁰	10
20.	²⁶⁴ EMFRKQLDEGL ²⁷⁴	11
21.	²⁸⁶ VQRDEIE ²⁹²	7
22.	³⁰⁰ PGSINPHTKFKG ³¹¹	12
23.	³¹⁷ SKDEGGRHTPPFFNN ³³⁰	14
24.	³⁵⁰ AGTEMVM ³⁵⁶	7
Białko ADA		
25.	³⁶ IILPSSDKELRKYVIAPAQTESLVD ⁶⁰	25
26.	¹⁰⁵ LSMDKGLTA ¹¹³	9
27.	¹⁴⁵ SSIIKTTK ¹⁵¹	7
28.	¹⁷⁴ EFSYPTDS ¹⁸¹	8
29.	²²⁷ TGQRD ²³¹	5
30.	²⁵³ TKAASSIQSF ²⁶²	10
31.	³⁰¹ TKIE ³⁰⁴	4
32.	³¹⁹ TSDSEKDTLLHKLQENYD ³³⁶	18

Lp.	Sekwencja	Długość (liczba aminokwasów)
Bialko FnBPA		
33.	¹⁹⁵ TDVTSKVTVE ²⁰⁴	10
34.	³⁶⁸ IKPNNGKTTSTVT ³⁸⁰	13
35.	²³² KFENGLHQGDYFDFT ²⁶⁴	15
36.	³⁴² GNYYAN ³⁴⁷	6
37.	⁴¹⁵ ANTTDTSKFKEVTSNMSGNLLQNNG ⁴⁴⁰	26
38.	⁴⁴³ SLNIENLDKTYV ⁴⁵⁴	12
39.	³⁸⁸ SNQNGNQPKVRIFEYLGNNEDIA ⁴¹⁰	23
40.	²⁷⁶ EVLEGGKIRYFTNDIEDKVDV ²⁹⁷	22
41.	³¹² VQTNGNQTTSTLNEEQTSKELD ³³⁴	23
42.	¹⁹⁵ TDVTSKVT ²⁰²	8
43.	²³² KFENGLHQGDYFDFT ²⁴⁶	15
44.	⁴¹⁵ ANTTDTSKFKEVTSNMNLLQNNGSYSLNIENLDKTYV ⁴⁵⁴	38
45.	³⁶⁸ IKPNNGKTTSTVT ³⁸¹	14
46.	⁴⁷⁴ MVGHPYT ⁴⁹¹	7
47.	³⁸⁷ GSNQNGNQPKVRIFEYLGNNEDIA ⁴¹⁰	24
48.	²⁶⁷ NGSVVMATGEVLEGGKIRYFTNDIEDKVDV ²⁹⁷	31
49.	³⁴² GNYYA ³⁴⁶	5
50.	⁴⁵⁸ DGEYLNGT ⁴⁶⁵	8
51.	³⁵⁷ KANNR ³⁶¹	5

Piśmiennictwo:

- Hogeveen, H., Huijps, K., and Lam, T. J. G. M. (2011). Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.* 59:16–23. doi: 10.1080/00480169.2011.547165.
- Philpot, W. N., and Nickerson, S. C. (1991). *Mastitis: Counter Attack: A Strategy to Combat Mastitis*. Chicago.
- He, W., Ma, S., Lei, L., He, J., Li, X., Tao, J., et al. (2020). Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. *Vet. Microbiol.* 242:108570. doi: 10.1016/J.VETMIC.2019.108570.
- Dufour, S., Labrie, J., and Jacques, M. (2019). The Mastitis Pathogens Culture Collection. *Microbiol. Resour. Announc.* 8:133–52. doi: 10.1128/MRA.00133-19.
- Lassa, H., Kubiak, J., and Małkińska-Horodyska, M. (2013). Antibiotic susceptibility of the bacteria most often isolated from clinical mastitis in cows. *Życie Weterynaryjne*. 88:651.
- Wilson, D. J., Gonzalez, R. N., and Das, H. H. (1997). Bovine Mastitis Pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count and Milk Production. *J. Dairy. Sci.* 80:2592–8. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(97)76215-5.
- Kulkarni, A. G., and Kaliwal, B. B. (2013). Bovine mastitis: a review. *International Journal of Recent Scientific Research* 4:543–8.
- Yalçın, C. (2000). Cost of Mastitis in Scottish Dairy Herds with Low and High Subclinical Mastitis Problems. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 24:465–72.
- Park, H. M., Almeida, R. A., and Oliver, S. P. (2002). Identification of lactoferrin-binding proteins in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* and *Streptococcus agalactiae* isolated from cows with mastitis. *FEMS. Microbiol. Lett.* 207:87–90. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb.11033.x.
- Fang, W., and Oliver, S. P. (1999). Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 176:91–6. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13647.x.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–5. doi: 10.1038/227680a0.

12. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. (2003). Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol.* 41:4465–7. doi: 10.1128/JCM.41.9.4465-4467.2003.
13. Banner M. A., Cuniffe J. G., Macintosh R. L., Foster T. J., Rohde H., Mack D., et al. (2007). Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol.* 189:2793–804. doi: 10.1128/JB.00952-06
14. Galfrè G., Milstein C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 73:3–46. doi: 10.1016/0076-6879(81)73054-4.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus*, **znamienny tym**, że w próbce materiału biologicznego, zwłaszcza mleka, z wymienia testowanej krowy bada się obecność następujących antygenów:
 - pochodzącego z *E. coli* białka ompA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 1 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 5–13,
 - pochodzącego z *S. uberis* białka EF-Tu o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 2 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 14–24,
 - pochodzącego z *S. agalactiae* białka ADA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 3 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 25–32 oraz
 - pochodzącego z *S. aureus* białka FnBPA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 4 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 33–51,przy czym:
 - stwierdzenie obecności antygenu pochodzącego z *E. coli* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *E. coli* wywołującym mastitis,
 - stwierdzenie obecności antygenu pochodzącego z *S. uberis* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *S. uberis* wywołującym mastitis,
 - stwierdzenie obecności antygenu pochodzącego z *S. agalactiae* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *S. agalactiae* wywołującym mastitis, natomiast
 - stwierdzenie obecności antygenu pochodzącego z *S. aureus* świadczy o zakażeniu wymienia testowanej krowy gatunkiem *S. aureus* wywołującym mastitis.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do badania obecności antygenów stosuje się specyficzne wobec nich przeciwciała.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że obecność antygenów wykrywa się metodą immunochromatograficzną.
4. Kompozycja diagnostyczna do wykrywania mastitis wywołanego przez *E. coli*, *S. uberis*, *S. agalactiae* lub *S. aureus*, **znamienna tym**, że zawiera odczynniki, zwłaszcza przeciwciała, nadające się do wykrywania obecności następujących antygenów:
 - pochodzącego z *E. coli* białka ompA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 1 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 5–13,
 - pochodzącego z *S. uberis* białka EF-Tu o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 2 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 14–24,
 - pochodzącego z *S. agalactiae* białka ADA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 3 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 25–32 oraz
 - pochodzącego z *S. aureus* białka FnBPA o sekwencji aminokwasowej Sekw. Id. Nr 4 lub zawartych w nim epitopów przedstawionych w Tabeli 1 o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród Sekw. Id. Nr 33–51.

5. Kompozycja diagnostyczna według zastrz. 4, **znamienna tym**, że zawiera specyficzne wobec antygenów określonych w zastrz. 4 przeciwciała monoklonalne lub poliklonalne.
6. Kompozycja diagnostyczna według zastrz. 4, **znamienna tym**, że zawiera znakowane przeciwciała.

Rysunki

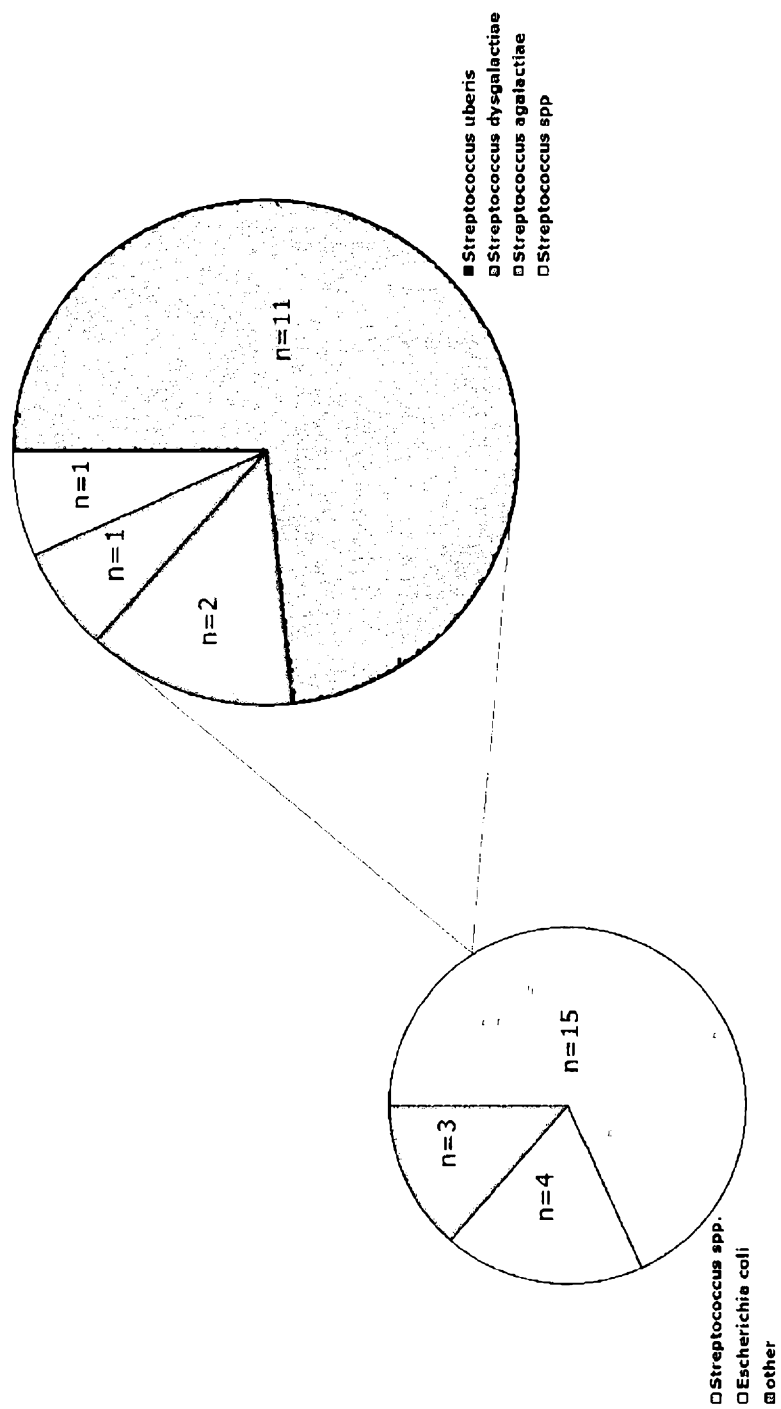


Fig. 1

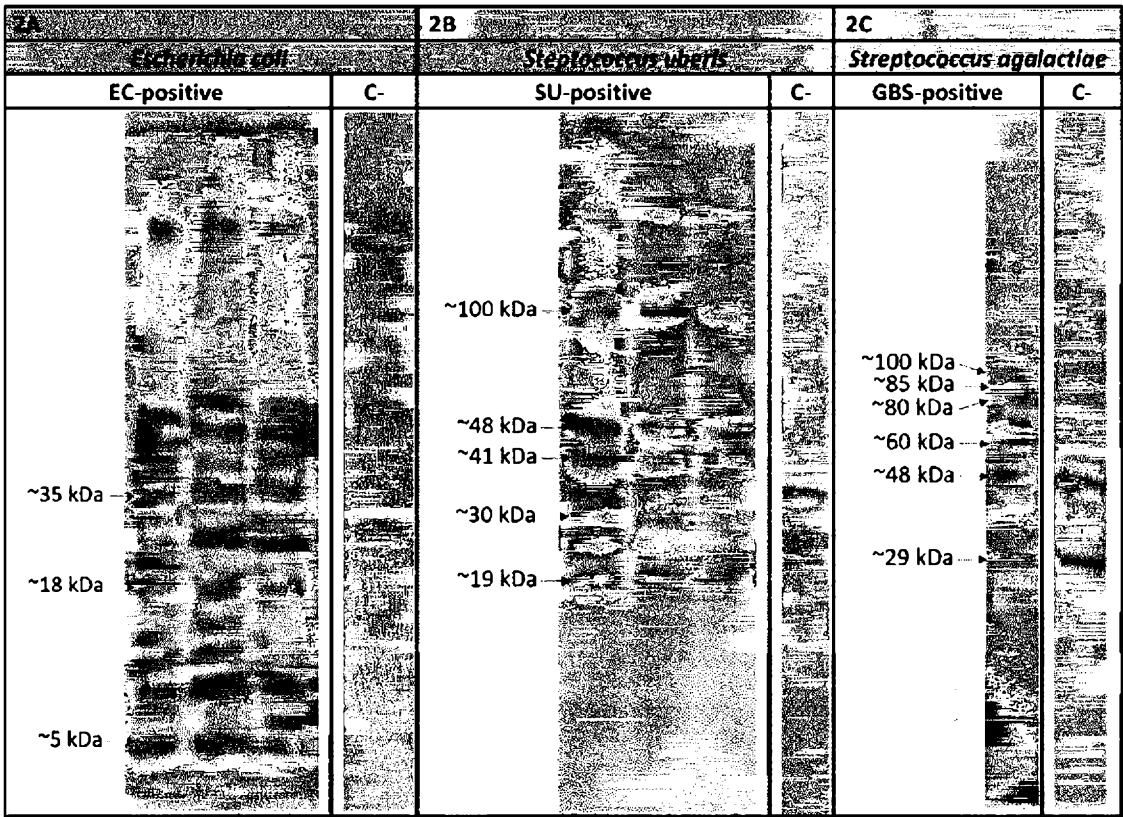


Fig. 2

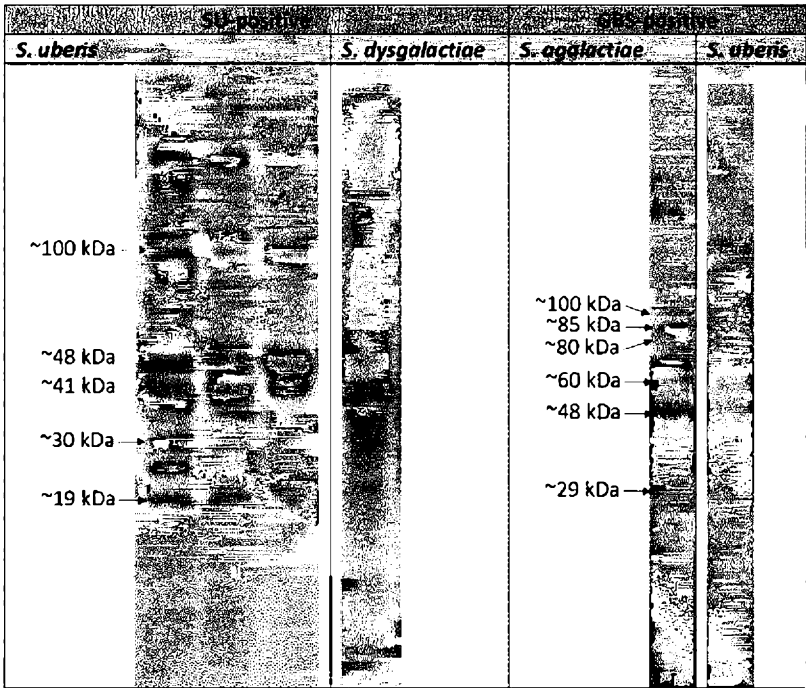


Fig. 3

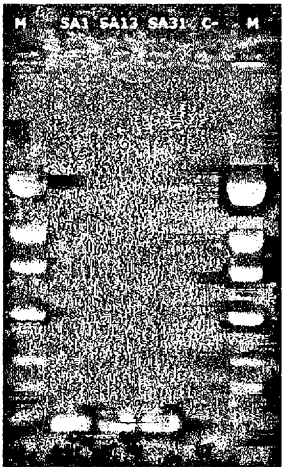


Fig. 4

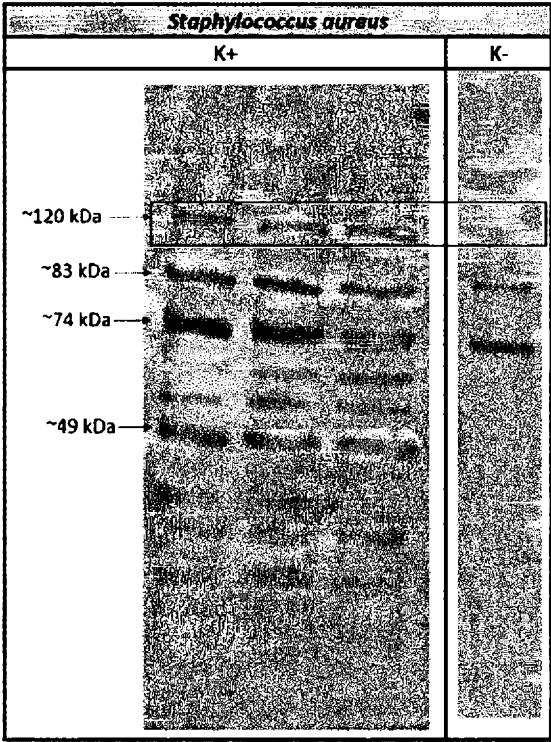


Fig. 5

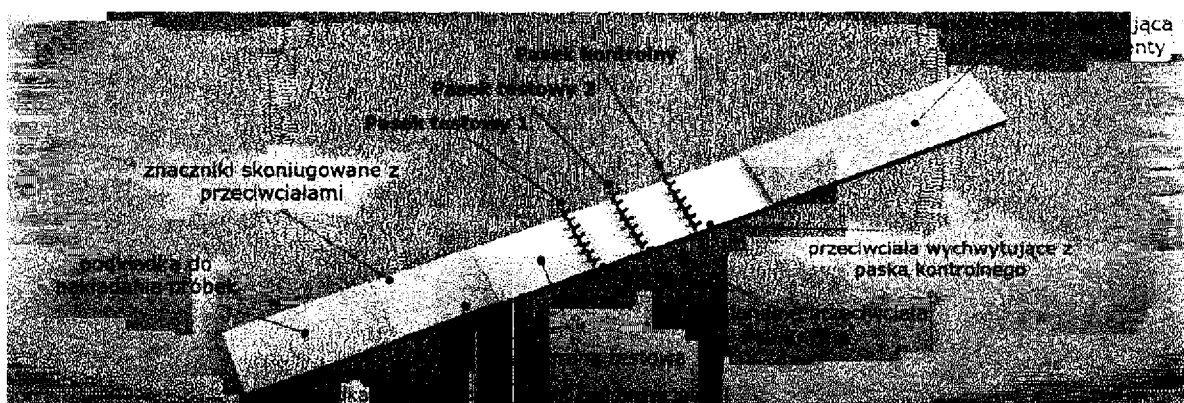
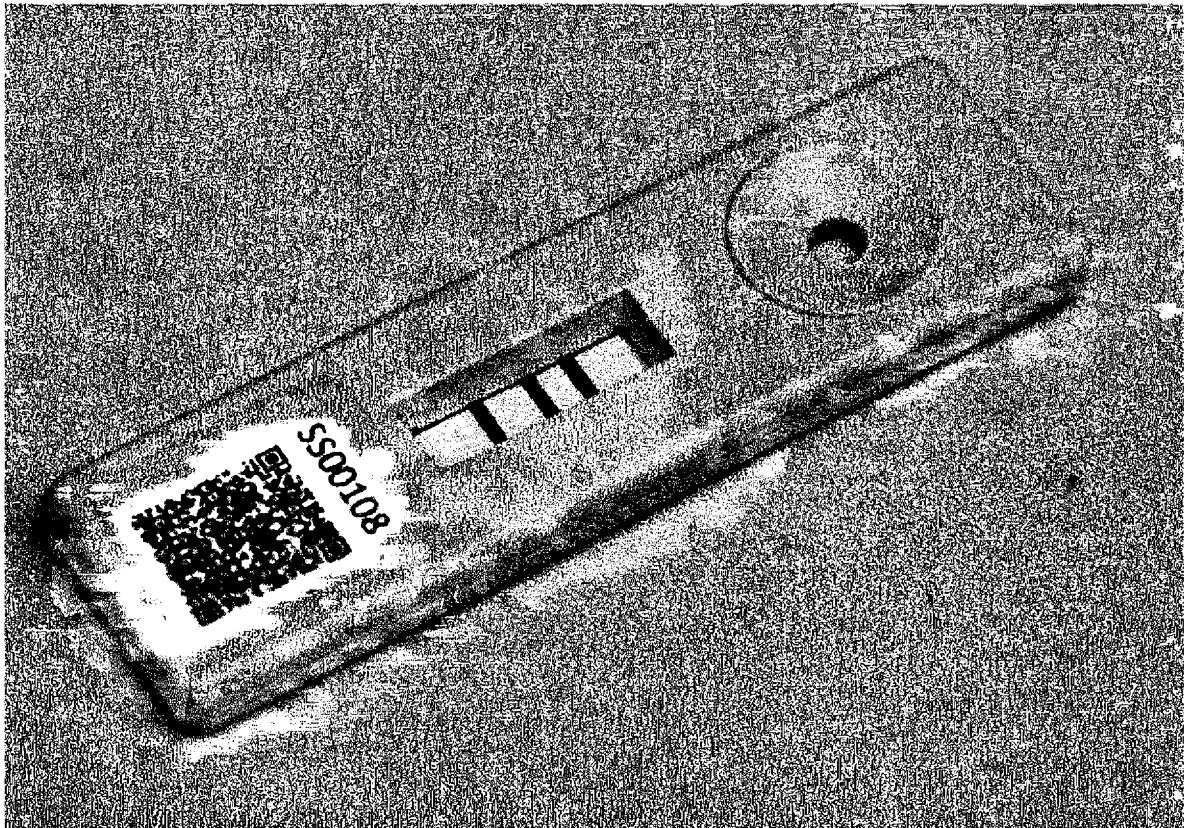


Fig. 6

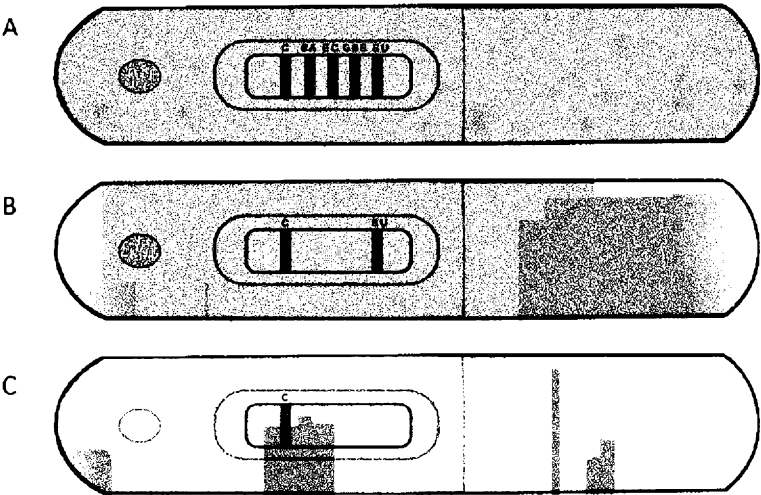


Fig. 7