

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut

Maria Mängel

Biosensorsüsteem *Streptococcus dysgalactiae* määramiseks

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad: Toonika Rinke, PhD

Delia Peedel, PhD

Tartu 2021

Biosensorsüsteem *Streptococcus dysgalactiae* määramiseks

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhinev biosensor lüpsilehmadel mastiiti põhjustava patogeeni *Streptococcus dysgalactiae* määramiseks ning konstrueeritud biosensori testimine reaalsetes piimaproovides. *Str. dysgalactiae* on keskkondlik ning nakkuslik patogeen, mis põhjustab lüpsilehmadel udarapõletikku ehk mastiiti. Mastiiti põhjustavate patogeenide määramiseks kasutatakse enamasti aeganõudvaid mikrobioloogilisi meetodeid. Biosensorite kasutamine võimaldab patogeenide kiiret identifitseerimist lüpsstavas piimas ning suunatud ravi õigeaegset alustamist. Biosensoriga on võimalik teostada mõõtmisi reaalajas ning farmis kohapeal. *Str. dysgalactiae* biosensoriga saadi analüüsi tulemused 21 minutiga.

Märksõnad: *Streptococcus dysgalactiae*, biosensor, mastiit, patogeeni määramine, toorpiim

CERCS: P300, Analüütiline keemia; T270, Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll; T360, Biokeemiatehnoloogia

Biosensing system for the detection of *Streptococcus dysgalactiae*

The aim of the present work was to develop an antigen-antibody based biosensor system for the detection of *Streptococcus dysgalactiae* and test this biosensor in real milk samples. *Streptococcus dysgalactiae* is one of the major environmental pathogens causing bovine mastitis. Currently pathogens are detected with time-consuming methods. Biosensors are a good alternative to reduce analysis time and carry out on-site analysis, allowing to start timely and focused treatment of infected animals. The analysis time with the studied *Str. dysgalactiae* biosensor was 21 minutes.

Keywords: *Streptococcus dysgalactiae*, biosensor, mastitis, pathogen detection, raw milk

CERCS: P300, Analytical chemistry; T270, Environmental technology, pollution control; T360, Biochemical technology

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Mastiit ja sellega seotud probleemid	6
1.2. <i>Str. dysgalactiae</i> bakter	7
1.3. Patogeenide määramise meetodid	7
1.3.1. Mikrobioloogilised külvid	8
1.3.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	8
1.3.3. Fluorestsents in situ hübridisatsioon (FISH)	9
1.3.4. MALDI-TOF MS	10
1.4. Biosensorid patogeenide määramiseks.....	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1. Kasutatud reaktiivid ja materjalid	14
2.2. Kasutatud seadmed	14
2.3. Metoodikad.....	15
2.3.1. <i>Str. dysgalactiae</i> suspensiooni valmistamine	15
2.3.2. <i>Str. dysgalactiae</i> määramine	15
2.3.3. Bioaktiveeritud graanulite valmistamine.....	17
2.3.4. Protokoll <i>Str. dysgalactiae</i> määramiseks biosensoriga	18
2.3.5. Piimaproovide analüüs	20
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	21
3.1. <i>Str. dysgalactiae</i> biosensori disain	21
3.2. <i>Str. dysgalactiae</i> biosensori selektiivsus	22
3.3. <i>Str. dysgalactiae</i> määramine	23
3.4. <i>Str. dysgalactiae</i> biosensori testimine	28
KOKKUVÕTE	29
KASUTATUD KIRJANDUS	30
SUMMARY	35
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	36

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

BIA	graanulisestusanalüüs, Bead Injection Analysis
CFU	kolooniaid moodustav üksus, colony forming unit
FIA	voogsisestusanalüüs, Flow Injection Analysis
FISH	fluorestsents in situ hübridisatsioon, fluorescent in situ hybridization
Fc	immunoglobuliin G kristalliseeruv fragment, fragment crystallizable
IgG	immunoglobuliin G
LAMP	silmus-vahendatud isotermiline amplifikatsioon, loop-mediated isothermal amplification
LOD	määramispiir, limit of detection
LOQ	kvantifitseerimispiir, limit of quantitation
MALDI-TOF MS	maatriks-assisteeritud laser-desorptsioon-ionisatsioon-lennuajaanalüsaator mass-spektromeeter, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
PBS	fosfaatpuhver soolaga
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon, polymerase chain reaction
mPCR	multipleksne polümeraasi ahelreaktsioon
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

SISSEJUHATUS

Looduses on palju erinevaid patogeene ning nende kiire määramine on veterinaarmeditsiinis ja toiduainetööstuses väga oluline. Udarapõletik ehk mastiit on lüpsilehmade seas kõige levinum haigus, mistõttu mõjutab see piimakarju üle maailma. Mastiiti põhjustavad väga mitmed patogeenid ning üheks nendest on *Streptococcus dysgalactiae*. Patogeenide kiire identifitseerimine lüpsstavas piimas võimaldab alustada õigeaegset ning suunatud ravi, vähendades mastiidi tõttu põhjustatud majanduslikku kahju, sh. ka kasutatavate antibiootikumide hulka.

Mastiiti põhjustavate patogeenide määramiseks kasutatakse enamasti aeganõudvaid mikrobioloogilisi meetodeid, mistõttu on tekkinud vajadus uute, kiiremate meetodite järele. Üheks võimaluseks patogeene kiirelt määrata on kasutada biosensoreid. Biosensorid on selektiivsed, tundlikud ja kompaktsed ning võimaldavad kohapealset analüüsi.

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhinev biosensor lüpsilehmadel mastiiti põhjustava patogeeni *Streptococcus dysgalactiae* määramiseks, ning konstrueeritud biosensori testimine reaalsetes piimaproovides. Biosensor konstrueeriti nii, et seda oleks võimalik integreerida teiste enamlevinud mastiiti põhjustavate patogeenide (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ja *Streptococcus uberis*) määramiseks kasutatava biosensorsüsteemiga. See võimaldab erinevate patogeenide üheaegset määramist, kus määratavad patogeenid seotakse tahkele kandjale ning detekteeritakse selektiivsete antikehadega, mis on eelnevalt konjugeeritud erinevate fluorestsentsmarkeritega.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mastiit ja sellega seotud probleemid

Udarapõletik ehk mastiit on maailmas kõige levinum piimakarjades leviv haigus [1]. Mastiit põhjustab suurt majanduslikku kahju: suurenenud ravi- ja töökulud, loomade suremuse tõus, piimatoodangu vähenemine - viimast põhjustavad nii toodangu hulga langus kui vajadus ravialuste lehmade piima utiliseerimiseks [2]. Patogeenide (haigusi põhjustavad bakterid/mikroobid) sisaldus piimas vähendab toorpiima kvaliteeti ning sellise piima joomine võib inimesele olla ohtlik. Olemasolevate meetmete tõhustamist toorpiima ohutuse tagamiseks on soovitatud ka varasemas Eestis tehtud uurimuses [3].

On teada üle 150 patogeeni, mis võivad lüpsilehmadel mastiiti põhjustada, kuid kõige olulisemad patogeenid on *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*), *Mycoplasma bovis*, koagulaaspositiivne *Staphylococcus* ja *Klebsiella* spp. (*Klebsiella pneumoniae* ja *Klebsiella oxytoca*) [4]. 2019. aastal Eestis põhjustasid eelnevalt nimetatud patogeenid üle 75% mastiidijuhtudest, nendest üle 10% *Str. dysgalactiae* [5].

Mastiiti võib nakkusallika põhjal jagada kahte kategooriasse [5]: nakkuslik mastiit, mis on saadud nakkusbakterite levimisega lehmalt lehmale lüpsmise ajal ning keskkondlik mastiit, kus infektsioon on saadud keskkonnast (peamiselt gram-negatiivsed patogeenid). Lisaks jaotakse mastiiti kliinilise avaldumise järgi kliiniliseks ja subkliiniliseks [5]. Kliinilise mastiiti korral piima koostis ja välimus muutub, piimatoodang väheneb ning esinevad põletikutunnused piimanäärmetes. Kliinilise mastiidi korral on vähemalt üks põletikutunnus märgatav kliinilistel uuringutel. Subkliinilise mastiidi korral lehmaga selged haigustunnused puuduvad, kuid väheneb piimatoodang ning põletikuindikaatorite sisaldus suureneb. [6] Kliinilise mastiidi esinemissagedus sõltub loomade kasvatamise viisist ning regioonist, varieerudes 13 – 60 juhtumini 100 lehma kohta aastas [7].

1.2. *Str. dysgalactiae* bakter

Str. dysgalactiae avastas 1932. aastal K. Diernhofer, kuid uue liigina tunnustati seda alles 1983. aastal [8]. Bakteri nimi tuleneb kreeka keelest: „*dys*“ tähendab halba ning „*galactiae*“ piima, viidates veiste mastiidi põhjustamisele [9]. *Str. dysgalactiae* on gram-positiivne Streptokokkide perekonda kuuluv bakter [10]. Enamasti on *Str. dysgalactiae* sfäärilise või ovaalse kujuga bakter, mis vedelikus esineb sageli paaride või ahelatena. Bakteriraku läbimõõt on 0,5 – 2 µm [11].

Str. dysgalactiae bakterit peetakse nii nakkuslikuks kui ka keskkonnapatogeeniks, kuna võib levida lüpsmise ajal lehmalt lehmale, kuid samas leidub seda ka loomi ümbritsevas keskkonnas (näiteks sõnnikus) [12]. Vaatamata selle patogeeni suurele levimusele on *Str. dysgalactiae* virulentsust soodustavate tegurite kohta vähe teada [13]. *Str. dysgalactiae* võib oma rakumembraanil olevate pinnavalkude ehk pinnaantigeenide vahendusel interakteeruda mitmete plasma ja rakuväliste peremeesorganismist saadud valkudega, näiteks immunoglobuliin G (IgG), albumiini, fibronektiini, fibrinogeeni, kollageeni, vitronektiini, plasminogeeni ja α₂-makroglobuliiniga [13].

1.3. Patogeenide määramise meetodid

Mastiiti põhjustavaid patogeene määratakse enamasti mikrobioloogiliste külvide või PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) meetodi abil, kuid mõlemad meetodid on küllaltki aeganõudvad ja tulemuste saamine võib võtta aega 3 tundi kuni mitu päeva. Seega patogeenide kiire identifitseerimine lüpsstavas piimas võimaldaks õigeaegselt identifitseerida mastiiti põhjustava patogeeni ning alustada loomade õigeaegset ravi sobiva antibiootikumiga, mis vähendab praakpiima hulka ja aitab parandada loomade tervist [14]. Antibiootikumide laialdase ja kontrollimata või vale kasutamise tõttu tekib järjest enam probleeme mikroorganismide suureneva resistentsusega. Paljud veterinaar- ja humaanmeditsiinis kasutatavad antibiootikumid on samad, mistõttu resistentsuse tekkimisel ei saa antibiootikume kasutada ka humaanmeditsiinis, sest haigustekitajad ei allu ravile. [2,15]

1.3.1. Mikrobioloogilised külvid

Mikrobioloogiliste külvide meetod on kõige vanem patogeensete mikroorganismide määramise meetod ning seda kasutatakse standardmeetodina igapäevaanalüüsideks. Mikroorganismide kultuure kasvatatakse söötmetel, mis on kohandatud konkreetsele kasvatatavale organismile. Need sisaldavad ühendeid, mis pärsivad segavate mikroorganismide kasvu ning toitained, mida on vaja uuritava bakteri kasvamiseks. Sageli lisatakse söötmele indikaatorvärvi, mis näitab, kas kasvu ajal on toimunud konkreetne metaboolne reaktsioon. Bakterikolooniaid saab loendada mikroskoobi abil või visuaalsel vaatlusel. [16]

Bakteri kolooniate külvamise ning loendamise meetod on küll selektiivne, aga kuna määratakse ainult kasvuvõimelisi patogeene (samas elujõulised bakterid võivad minna ka puhke seisundisse), võib loendamine anda valenegatiivseid tulemusi [17,18]. Kui külvatava proovi suurus on 10 µl, siis meetodi hinnanguline määramispiir on $4 \cdot 10^2$ CFU/ml (kolooniat moodustav üksus milliliitris), sest positiivseks loetakse proov, kus külviplaadil tekib vähemalt neli kolooniat [6]. Meetodit saab rakendada erinevates proovi maatriksites. Mikrobioloogiliste külvide meetod on üldiselt töömahukas ning on aeganõudev (mitu päeva kuni mitu nädalat), kuna vahel on vajalik teha lisakülve. [17,18]

1.3.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Lisaks mikrobioloogilistele külvidele kasutatakse nakkushaigusi põhjustavate patogeenide identifitseerimiseks nukleiinhapete amplifikatsioonil põhinevaid meetodeid. 1983. aastal töötas Kary Mullis välja polümeraasi ahelreaktsiooni meetodi (PCR), mis põhineb soovitud geneetilise materjali kiirel eksponentsiaalsel kordistamisel [17,19]. Enim kasutatakse viimasel ajal multiplekset polümeraasi ahelreaktsiooni (mPCR) ning kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR). mPCR tuvastatakse või amplifitseeritakse samaaegselt mitut sihtmärki. qPCR meetod võimaldab produkti kvantitatiivset määramist, sest kasutatakse fluoretsentsvärvi PCR amplikonide märgistamiseks ning analüüsi käigus mõõdetav fluoretsentsisignaali suureneb proportsionaalselt, kui sihtmärki on amplifitseeritud. [16,19]

PCR on võrreldes mikrobioloogiliste külvidega kiirem ja spetsiifilisem ning võimaldab eristada ka erinevaid mikroobi tüvesid. Analüüsi tegemise aeg varieerub vahemikus 3 – 6 tundi.

Meetodi määramispiir on ligikaudu $10 - 10^2$ CFU/ml [20–22]. Meetod on selektiivne, kuid ei võimalda eristada elusaid ja surnud rakke. Analüüsi läbiviimiseks on vaja proovi ettevalmistus. PCR läbiviimiseks on vajalik väljaõppinud personal ning kallid laboriseadmed. [17,22]

PCR rakendusi kasutatakse patogeensete bakterite tuvastamiseks paljudes toiduainetes, sealhulgas toorpiimas, lõssipiimas ja juustus [22]. Saadaval on kommertsiaalsed testid *Str. dysgalactiae* määramiseks piimas, mille läbiviimiseks kulub 3 tundi ning mis ei vaja eelnevat kolooniate kasvatamist [23,24]. Näiteks Mastitis 16 test võimaldab määrata 16 enamlevinud mastiiti põhjustavat patogeeni. PCR analüüside puuduseks on asjaolu, et testide tulemust on farmeritel raske tõlgendada, sest näidatakse kõikide leitud patogeenide esinemise tasemeid ning mastiidi peapõhjustajat on raske identifitseerida [25]. Seetõttu on efektiivse ravi alustamine keeruline.

Silmus-vahendatud isotermiline amplifikatsioon (LAMP) (ingl. k. *loop-mediated isothermal amplification*) on alternatiivne meetod nukleiinhapete amplifitseerimiseks konstantsel temperatuuril. LAMP meetod on kiirem (30 – 60 min) kui traditsiooniline PCR ning ei vaja kulukaid eriseadmeid. Samas on piiratud reaktiivide ja instrumentide kättesaadavus, puudub multipleksse määramise võimalus ning vajalik on proovi eeltöötlus. [26]

1.3.3. Fluorestsents in situ hübridisatsioon (FISH)

Üheks võimaluseks mastiiti põhjustavate patogeenide määramiseks piimaproovides on laboratoorne meetod FISH (ingl. k. *fluorescent in situ hybridization*), kus kasutatakse fluorestsentsmärgisega oligonukleotiidi sonde, mis seonduvad kromosoomis komplementaarsuse alusel konkreetse DNA või RNA järjestusega. FISH meetodiga saab tuvastada erinevaid liike korraga, sest ühes testis saab kasutada mitut erinevat fluorofooriga märgistatud oligonukleotiidi sondi. Fluorestseeruvad kromosoomid määratakse mikroskoopiliselt. [16] Olemasoleva meetodi määramispiir reaalsetes piimaproovides oli 10^6 CFU/ml. Meetod on kultuuri kasvatamisest sõltumatu, kuid proovid vajavad ensümaatilist eeltöötlust savinaasiga. Kokku võtab patogeenide määramine selle meetodiga aega 2,5 h. [27]

1.3.4. MALDI-TOF MS

Lisaks eelnimetatud meetoditele, määratakse patogeene kvalitatiivselt maatriks-assisteeritud laser-desorptsioon-ionisatsioon-lennuaja analüsaator mass-spektromeetriaga (MALDI-TOF MS). MALDI-TOF MS on analüüsimeetod, mille käigus proov segatakse maatriksiga, osakesed ioniseeritakse ja aurustatakse laseriga. Elektrivälja abil kiirendatakse ioone kolonni detektori suunas ning ioonid eraldatakse vastavalt massi/laengu suhtele. Detektor mõõdab iga iooni lennu aja, mille põhjal analüüt tuvastatakse. [16] Analüüs on kiire, umbes 2 min, kuid proov vajab eelnevat kultiveerimist ning kallist aparatuuri. Selle meetodiga on võimalik määrata liigitasandilise täpsusega vaid andmebaasides olevaid patogeene. [28] Proovitud on ka välja töötada meetodeid patogeenide määramiseks otse piimaproovidest, mis ei vaja eelnevat kultiveerimist, vaid suhteliselt kiiret proovi ettevalmistust. *Str. dysgalactiae* määramispiiriks on saadud 10^8 CFU/ml [29]. See määramispiir on palju kõrgem võrreldes teiste meetoditega ning ka patogeenide eeldatava sisaldusega mastiiti põdevate lehmade piimas, mis võib olla kliinilise mastiidi puhul isegi alla 10^3 CFU/ml [27].

Kokkuvõtlik ülevaade *Str. dysgalactiae* ning teiste patogeenide määramiseks kasutatavatest meetoditest on toodud tabelis 1.

Tabel 1. *Str. dysgalactiae* määramiseks kasutatavad meetodid

Metoodika	Patogeen	Proov	Aeg	LOD, CFU/ml	Määramisala, CFU/ml	Viide
Mikro-bioloogiline kultiveerimine	Kõik	Kõik	6-48 h	~400	~400 - 10 ⁵	[30]
PCR	<i>Str. dysgalactiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Str. agalactiae</i> , <i>Str. parauberis</i> , <i>Str. uberis</i> .	Piim	6 h	3,12·10 ²	---	[20]
	<i>Str. dysgalactiae</i> , <i>Str. uberis</i>	Piim	--	+/-	---	[31]
	<i>Str. dysgalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Str. uberis</i> , <i>Str. agalactiae</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	Piim	6,5 h	100	10 ² – 5·10 ³	[21]
	<i>Str. dysgalactiae</i> , <i>Str. agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Str. uberis</i> , <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>E. coli</i> jne.	Piim	3 h	---	---	[23,24]
LAMP	<i>Str. dysgalactiae</i> , <i>Str. uberis</i> , <i>Str. agalactiae</i>	Kultuur	1 h (vajalik eelnev kultiveerimine)	0,1 pg DNA (~ 5·10 ⁴ CFU/ml)	---	[32]
DNA amplifikatsioon	<i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Str. agalactiae</i> , <i>Str. bovis</i> , <i>Str. uberis</i> , <i>Str. dysgalactiae</i>	Piim	6 h	10 ⁴	10 ⁴ – 10 ⁷	[33]
MALDI-TOF MS	<i>Str. dysgalactiae</i>	Piim	2 min (vajalik eelnev kultiveerimine)	---	---	[34,35]
	<i>Str. dysgalactiae</i> , <i>Str. agalactiae</i> , <i>Str. uberis</i>	Piim	2 min (vajalik proovi ettevalmistus)	10 ⁸	---	[29]

1.4. Biosensorid patogeenide määramiseks

Viimastel aastatel on järjest enam hakatud pöörama tähelepanu erinevate biosensorite arendusele. Biosensorid on analüütilised seadmed, mis koosnevad bioloogilisest tuvastuselementist ning sellega ühendatud signaali detekteerimise ja interpreteerimise süsteemist. Bioloogiline äratundmiselement tunneb selektiivselt ära analüüdi, mida soovitakse tuvastada ja kvantifitseerida. Interaktsiooni tagajärjel genereeritakse signaal, mille alusel on võimalik leida analüüdi kontsentratsioon. Biosensoreid võib liigitada nende bioloogilise äratundmiselemendi ja/või signaali detekteerimisseadme põhjal. Bioloogilisi äratundmiselemente on väga erinevaid - ensüümid, antikehad, aptameerid, üheaahelaline DNA, RNA, rakud, mikroorganismid jne. Signaali detekteerimiseks kasutatakse põhiliselt elektrokeemilisi, optilisi ja piesoelektrilisi meetodeid. Biosensorid on selektiivsed, sest bioloogilist äratundmiselementi saab kohandada spetsiaalselt huvipakkuva analüüdi jaoks. [17,18,36]

Järjest enam on hakatud rõhku panema immunobiosensorite, milles kasutatakse bioloogilise äratundmiselemendina antikehasid, arendamisele. On olemas mitmeid immunobiosensorid, millega saab toiduproovidest (eelkõige piimaproovidest) määrata patogeene *E. coli* ning *S. aureus*. Nende biosensorite määramispiirid varieeruvad $10^1 - 10^5$ CFU/ml ning sõltuvad eelkõige signaali detekteerimismeetodist [37,38].

Erinevate Streptokokkide määramiseks konstrueeritud biosensorite määramispiirid jäävad vahemikku $10^1 - 10^2$ CFU/ml ning analüüsi aeg varieerub 3 – 90 minutini [14,39–45]. Kõikides nendes biosensorites kasutatakse bioäratundva elemendina spetsiifilisi antikehasid. Teadaolevalt ei ole seni konstrueeritud ühtegi immunobiosensorit *Str. dysgalactiae* määramiseks. Selle üks olulisemaid põhjusi on asjaolu, et *Str. dysgalactiae* jaoks ei ole saadaval kommertsiaalseid antikehasid. Kokkuvõtlik informatsioon käesoleval ajal väljapakutud biosensoritest Streptokokkide määramiseks piima, vee ja inimese sülje proovides on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Biosensorid Streptokokkide määramiseks

Biosensori põhimõte	Patogeen	Analüüdi äratundmissüsteem	Proov	Aeg	LOD, CFU/ml	Määramisala, CFU/ml	Viide
Immunobiosensor	<i>Str. uberis</i>	Antikeha	Piim	17 min	15	$10^2 - 10^6$	[14]
Amperomeetiline	<i>Str. agalactiae</i>	Antikeha	Vesi	90 min	10	$10^1 - 10^7$	[39]
Semi-kvantitatiivne magnetiline määramine	<i>Str. uberis</i> , <i>Str. agalactiae</i>	Antikeha	Piim	5 h	10^2	---	[40]
Optiline immunomagneetiline	<i>Str. agalactiae</i>	Antikeha	Piim	<30 min	10^2	$10^2 - 10^6$	[41]
Impedimeetiline	<i>Str. pneumonia</i>	Peptiid	PBS (fosfaat-puhver), inimese sülg	---	50	$50 - 5 \cdot 10^4$	[43]
Impedimeetiline	<i>Str. pyogenes</i>	Antikeha	PBS, inimese sülg	30 min	10^2	$10^2 - 10^5$ rakku/10 μ l	[42]
Impedimeetiline	<i>Str. pyogenes</i>	Antikeha	PBS	3 min	9,3	$4,2 \cdot 10^2 - 4,2 \cdot 10^6$	[44]
Pieosoelektriline	<i>Str. pyogenes</i>	Aptameer	Piim	<40 min	12	$3 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^6$	[45]

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Kasutatud reaktiivid ja materjalid

1. anti-*Streptococcus dysgalactiae* antikeha (eraldatud küüliku vereseerumist, toodetud firmas Davids Biotechnologie GmbH)
2. Coomassie Brilliant Blue R 250 $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ (Fluka AG)
3. Dialüüsi membraan (MWCO 6 – 8 kD, Spectra/Por, Spectrumlabs)
4. Etanool C_2H_5OH (96%)
5. Etanoolamiin C_2H_7NO (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$)
6. Epikloorhüdriin C_3H_5ClO (Acros Organics, min 99%)
7. IgG Fc (valmistatud inimese vereseerumist eraldatud IgG antikehadest TÜ Keemia instituudi biosensorite laboris)
8. Kaaliumdivesinikfosfaat KH_2PO_4 (AppliChem, min 99,5%)
9. Naatriumhüdrosiid NaOH (AppliChem, min 99%)
10. Naatriumkloriid NaCl (Sigma-Aldrich, $\geq 99,8\%$)
11. Naatriumkarbonaat Na_2CO_3 (AppliChem, min 99,5%)
12. Sephadex G-50 Medium (Pharmacia Fine Chemicals AB, osakeste suurus 80 – 150 μm)
13. *Streptococcus dysgalactiae* kultuur (10^9 CFU/ml)
14. Tween 20 $C_{58}H_{114}O_{26}$ (Biotop)
15. Vesinikkloriidhape HCl (Sigma-Aldrich, $\geq 37\%$)

2.2. Kasutatud seadmed

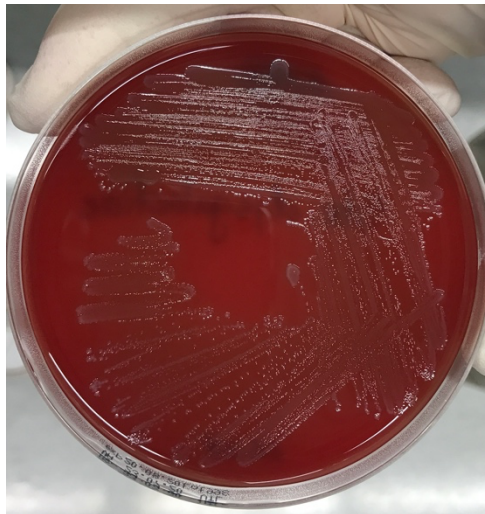
1. Analüütiline kaal PB602-S/FACT (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ mg
2. FIAlab 3500B (FIAlab)
3. Magnetsegaja MS3000 (Biosan)
4. Orbital shaker (ELMI Ltd, Läti)
5. pH-meeter (Mettler Toledo, Šveits), täpsus $\pm 0,02$ pH ühikut
6. Spektrofotomeeter USB 2000+ (Ocean Optics)
7. Tehniline kaal PB602-S/FACT (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ g

8. Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter, USA)
9. Spektrofotomeeter UV-1800 (Shimadzu, Jaapan)
10. Valgusallikas DH-2000 (Ocean Optics)
11. Vortex segaja (Heidolph, Saksamaa)

2.3. Metoodikad

2.3.1. *Str. dysgalactiae* suspensiooni valmistamine

Str. dysgalactiae bakterikultuur külvati Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis Petri tassile veriagari söötmele ja inkubeeriti 24 h aeroobses keskkonnas 37 °C juures. Moodustunud kolooniad (joonis 1) korjati steriilse tampooniga ning viidi PBS puhvrissse (10 mM; pH 7,20; 0,15 M NaCl). Suspensiooni tihedus mõõdeti UV-1800 UV/Vis spektrofotomeetriga neeldumise alusel lainepikkusel 600 nm. *Str. dysgalactiae* suspensioone säilitati külmutatult -20°C juures.

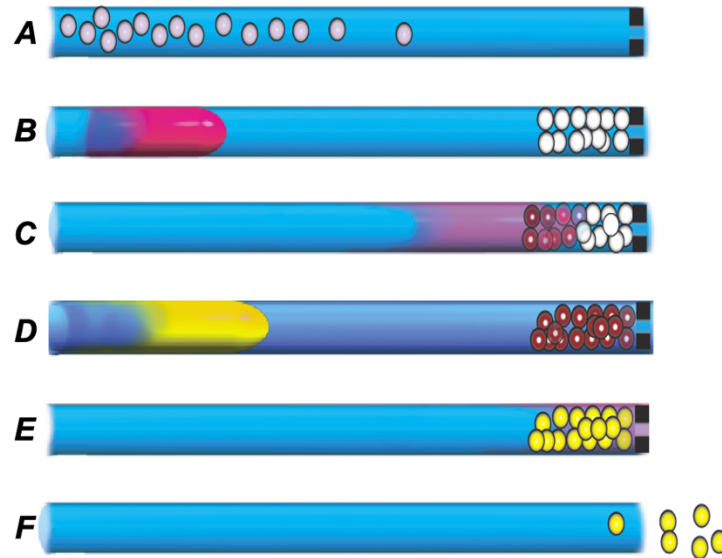


Joonis 1. *Str. dysgalactiae* kasvatatud kultuur veriagaril

2.3.2. *Str. dysgalactiae* määramine

Str. dysgalactiae määramiseks konstrueeriti immunobiosensor, mis põhineb antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil. Konstrueeritud immunobiosensor oli integreeritud graanulisestusanalüüsi (BIA) süsteemiga. BIA on voogsisestusalanüüsi (FIA) kolmanda põlvkonna täiendatud ja lihtsustatud variant, mille tööpõhimõte seisneb analüüti siduva ühekordse

mikrokolonni moodustamises ja seondunud analüüdi detekteerimises. BIA tööpõhimõte on skemaatiliselt kujutatud joonisel 2.



Joonis 2. Graanulisestusanalüüsi (BIA) põhimõtteline skeem [46]

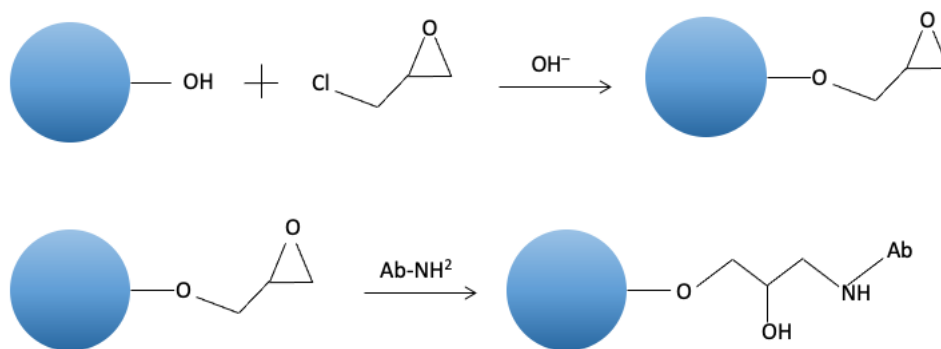
Esmalt sisestatakse bioselektiivsed mikrograanulid, millele on immobiliseeritud inimese IgG Fc fragment, osaliselt suletud voolukanalisse, kus moodustub mikrokolonn uuritava aine sidumiseks (joon. 2, A). Järgmisena sisestatakse voolukanalisse proov (joon. 2, B), milles olev määratav analüüt seondub graanulitele (joon. 2, C). Lisaks määratava aine kontsentreerimisele võimaldab see ka proovi maatriksi eemaldamise. Graanulitega seondunud analüüt detekteeritakse, sisestades süsteemi analüüti ära tundva spetsiifilise antikeha, mis on konjugeeritud fluorestsentsmarkeriga (joon. 2, D). Moodustub detekteeritav kompleks (joon. 2, E). Analüüsi lõpus voolukanalit sulgev tõke avatakse ning osakesed voolutatakse kanalist välja, süsteem pestakse ning see on valmis järgmise analüüsi läbiviimiseks (joon. 2, F).

BIA meetodi kasutamisel on väga oluline graanulite suurus, kuju ning materjal. Osakesed peavad olema sfäärilised ning nende suurus vahemikus 80 – 150 μm . Lisaks peavad olema graanulid läbipaistvad, et oleks võimalik teostada mõõtmisi nähtavas valguses. [46] Antud töös kasutati Sephadex G-50 Medium graanuleid, mille suurus jääb vahemikku 50 – 150 μm [47].

Kuna *Str. dysgalactiae* jaoks ei ole saadaval kommertsiaalseid antikehasid, disainiti esmalt multieptioopne peptiid. Selleks teostati bioinformaatiline analüüs, mille käigus leiti bakteri membraanvalkude iseloomulikud antigeensed regioonid ning hinnati aminohappejääkide eksponeeritust valgu pinnal. Seejärel kasutati disainitud peptiidi spetsiifiliste antikehade tootmiseks. Antikehad toodeti ja puhastati Davids Biotechnologie GmbH poolt. Puhastatud antikehad konjugeeriti DyLight 650® fluorentsmarkeriga, mille ergastuskiirguse lainepikkus on 652 nm ja emissioonkiirguse lainepikkus 672 nm.

2.3.3. Bioaktiveeritud graanulite valmistamine

Str. dysgalactiae sidumiseks kasutati inimese IgG Fc fragmendiga aktiveeritud graanuleid, mis valmistati varasemalt välja töötatud meetodika põhjal [48]. Kokkuvõtlik skeem geeli valmistamisest on toodud joonisel 3.



Joonis 3. Sephadex G-50 graanulite aktiveerimine inimese IgG Fc fragmendiga

Kokkuvõtlikult oli meetodika järgmine: 47,3 mg Sephadex G-50 Medium geelile lisati 1,0 ml Milli-Q vett (eritakistus 18,2 MΩ·cm), mis segati ja jäeti punduma 24 tunniks 4 °C juures. Pundunud geelile lisati 400 µl 0,4 M NaOH lahust, mis käitub lahuses katalüsaatorina, ning loksutati korralikult. Geeli aktiveerimiseks lisati 100 µl 5% epikloorhüdriini lahust ja asetati toatemperatuuril 3 tunniks loksutile. Geel tsentrifugeeriti (5 min 2450 x g) ning pesti kaks korda 685 µl Milli-Q veega ja üks kord 685 µl Na₂CO₃ puhvriga (0,5 M, pH 9,50), et eemaldada seondumata materjali. Iga pesu järel tsentrifugeeriti geel uuesti.

Inimese IgG Fc fragmendi lahust, millele oli lisatud 50% glütserooli, säilitati -20 °C juures. Glütserooli eemaldamiseks dialüüsi IgG Fc lahust 3 tundi 10 °C juures Na₂CO₃ puhvri vastu. 800 µl IgG Fc lahust (2 mg/ml Na₂CO₃ puhvris) lisati pundunud geelile ning inkubeeriti loksutil 24 tundi toatemperatuuril. Seejärel segu tsentrifuugiti (5 min 2450 x g) graanulite eraldamiseks ning graanuleid pesti Na₂CO₃ puhvriga. Immobiliseeritud valkude olemasolu geelil kontrolliti Coomassie Brilliant Blue R 250 lahuse abil. Vabade sidumiskohtade blokeerimiseks lisati geelile 685 µl etanoolamiini lahust (85 µl/ml) Na₂CO₃ puhvris ning segu loksutati 2 tundi toatemperatuuril. Seejärel suspensiooni tsentrifuugiti (5 min 2450 x g) ning pesti kaks korda 685 µl Milli-Q veega ning kuus korda 685 µl PBS puhvriga. Iga pesu järel korrati geeli tsentrifuugimist. Geelile lisati 685 µl PBS puhvrit ning hoiustati 4 °C juures.

2.3.4. Protokoll *Str. dysgalactiae* määramiseks biosensoriga

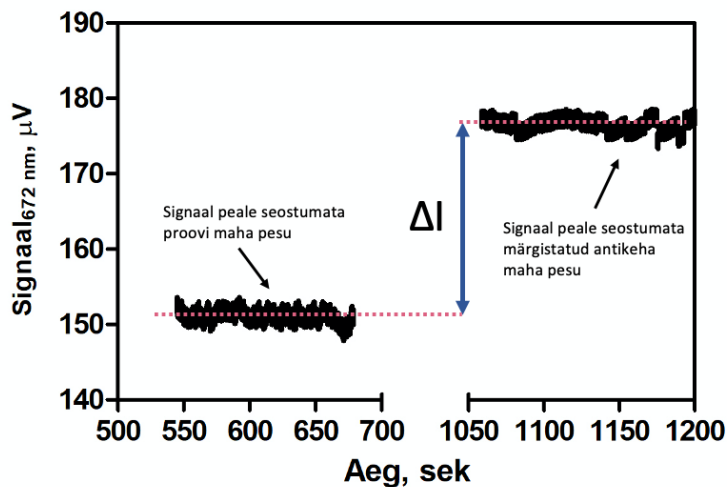
Mõõtmised teostati toatemperatuuril, kasutades voogsisestusanalüüsi süsteemi FIAlab 3500B. Fluorestsentsmarkeri ergastamiseks kasutati valgusallikana halogeenlampi DH-2000 ning lainepikkuste vahemiku 300-750 nm jaoks optimeeritud filtrit Ocean Optics LVF-HL ($\lambda = 652$ nm). Lainepikkus määrati spektrofotomeetriga, kasutades tarkvara SpectraSuit. Fluorestsentssignaali detekteerimiseks kasutati Ocean Optics USB 2000+ spektrofotomeetrit, millel oli tundlikkuse suurendamiseks modifitseeritud elektrooniline võimendussüsteem ja laiendatud 200 µm laiune pilu signaali kogumiseks. Mõõtmised viidi läbi lainepikkusel 672 nm.

Str. dysgalactiae määramiseks sisestati esmalt mõõterakku 20 µl inimese IgG Fc fragmendiga aktiveeritud mikrograanuleid voolutamiskiirusega 1 µl/s. Graanulite ühtlane sisestusvoog tagati nende pideva segamisega. Mikrograanulite transpordiks mõõterakku ning kolonni pakkimiseks lisati 30 µl PBS puhvrit voolutamiskiirusega 2 µl/s. *Str. dysgalactiae* baktereid sisaldavat analüüsitavat proovi sisestati süsteemi 150 µl voolutamiskiirusega 1 µl/s. *Str. dysgalactiae* inkubeerimisaeg, et tagada bakterite kinnitumine bioaktiveeritud geelile, oli 240 sekundit. Seejärel pesti mõõterakku mitteseondunud patogeeni rakkude eemaldamiseks 150 µl PBS puhvriga. Piimaproovide mõõtmistel pesti mõõterakku täiendavalt 1200 µl PBS puhvriga, et tagada proovi maatriksi võimalikult efektiivne eemaldamine. Seejärel sisestati mõõterakku 30 µl fluorestsentsmarkeriga DyLight 650® konjugeeritud anti-*Str. dysgalactiae* detekteerivat antikeha. Anti-*Str. dysgalactiae* antikeha seondumiseks *Str. dysgalactiae* bakteritele inkubeeriti 120

sekundit. Mitteseondunud antikeha pesti süsteemist välja 150 μl PBS puhvriga voolutamiskiirusel 2 $\mu\text{l/s}$. Moodustunud kompleksi fluorestsentsi mõõdeti 8 minuti jooksul perpendikulaarselt mikrokolonniga.

Mõõtmise lõpus avati voolukanali tõke ning pesti mõõterakku neli korda 1000 μl PBS. Piimaproovidega mõõtmiste teostamisel lisati rasva ladestumise vältimiseks PBS puhvrissi 0,01% Tween 20. Pärast mõõtmiste läbiviimist pesti süsteemi neli korda 1000 μl PBS puhvriga, kolm korda 70% etanooli lahusega ning kolm korda Milli-Q veega. Voolutamiskiirust pesemisel varieeriti 50 – 200 $\mu\text{l/s}$.

Biosensorsignaali väärtust iseloomustab *Str. dysgalactiae* kindlal kontsentratsioonil fluoretsentsignaali muutus ΔI , mis leiti stabiliseerunud signaali keskmiste fluoretsents intensiivsuste vahena enne detekteeriva antikeha lisamist ja pärast seondumata antikeha eemaldamist (joonis 4). Ühe analüüsi läbiviimiseks kulus ligikaudu 1260 sekundit. Igal *Str. dysgalactiae* kontsentratsioonil teostati 3 – 4 kordusmõõtmist, arvutati tulemuste keskmine väärtus ja standardhälve. Andmete analüüsimiseks kasutati tarkvara GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).



Joonis 4. Näide biosensori fluoretsentsignaali muutuse ΔI leidmistest

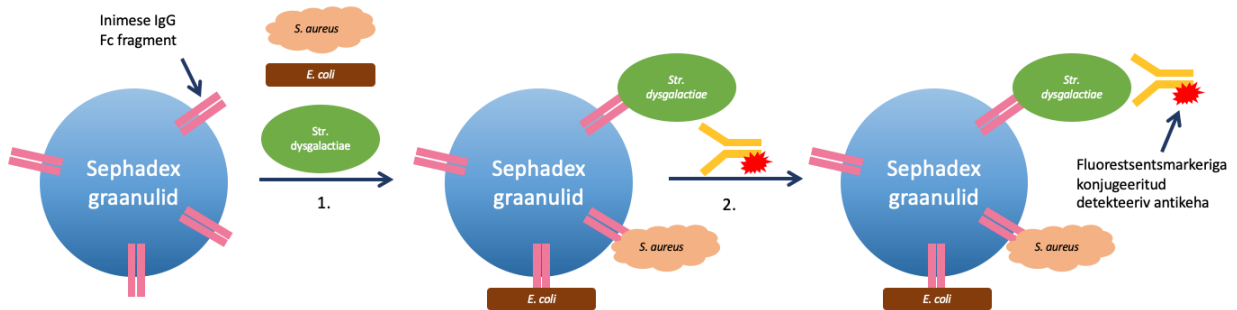
2.3.5. Piimaproovide analüüs

Mõõtmised piimas viidi läbi Nopri talu pastöriseerimata toorpiimaga. Toorpiim tsentrifuugiti 5 min (2450 x g) rasvade eemaldamiseks ning rasvavaba piim lahjendati 1:1 PBS puhvriga (10 mM; pH 7,20; 0,15 M NaCl). Positiivse kontrolli saamiseks lisati PBS puhvrise fikseeritud koguses baktereid, mis lisati piimale vahetult enne mõõtmisi. Biosensorit testiti ka *Str. dysgalactiae* poolt põhjustatud mastiiti põdevate lehmade piimaproovide, mis olid kogutud Kesk-Eesti piimafarmist, analüüsimisel. Patogeeni sisaldavad piimaproovid külmutati kogumisel kohe -20 °C juures ja sulatati üles vahetult enne analüüsi tegemist, et vältida bakterite paljunemist. Patogeeni sisaldavad piimaproovid töödeldi sarnaselt eespool kirjeldatule. Analüüsimiseks kasutatud piimaproovides oli *Str. dysgalactiae* eelnevalt identifitseeritud ka mikrobioloogiliste külvide abil.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. *Str. dysgalactiae* biosensori disain

Käesolevas töös konstrueeritud immunobiosensor *Str. dysgalactiae* määramiseks põhineb antigeen-antikeha vahelisel bioäratundmissüsteemil. Põhimõtteline skeem *Str. dysgalactiae* kvantitatiivseks detekteerimiseks biosensoriga on toodud joonisel 5.



Joonis 5. *Str. dysgalactiae* määramise skeem. 1. Bakterid kinnituvad graanulile immobiliseeritud inimese IgG Fc fragmendile, 2. Fluorestsentsmarkeriga konjugeeritud anti-*Str. dysgalactiae* antikeha kinnitub selektiivselt seondunud *Str. dysgalactiae* bakterile – moodustub detekteeritav kompleks.

Proovis sisalduvad *Str. dysgalactiae* bakterid seoti välismembraani valkude abil inimese IgG Fc fragmendiga aktiveeritud Sephadex G-50 Medium geelile ning seondunud bakterite määramiseks kasutati fluorestsentsmarkeriga märgistatud spetsiifilist antikeha. Tekkinud antigeen/antikeha kompleks tuvastati fluorestsentsi mõõtmise kaudu. Kuna *Str. dysgalactiae* jaoks puuduvad spetsiifilised kommertsiaalsed antikehad, siis kasutati *Str. dysgalactiae* biosensoris spetsiaalselt disainitud antikeha, mis oli konjugeeritud fluorestsentsmarkeriga DyLight® 650. DyLight® 650 markeri ergastuskiirguse lainepikkus on 652 nm ja emissioonkiirguse lainepikkus 672 nm.

Str. dysgalactiae patogeeni määramiseks kasutati selle seondumist inimese IgG Fc fragmendiga aktiveeritud mikrograanulitele. Selliselt aktiveeritud graanulitele seonduvad mastiiti tekitavatest patogeenidest veel *S. aureus* ja *E. coli*, kuid see ei sega nende patogeenide üheaegset

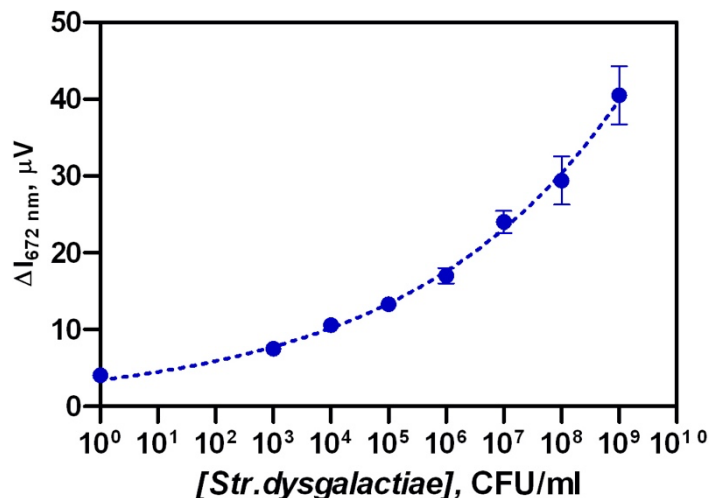
määramist, kuna biosensorsüsteemis kasutatakse seondunud patogeenide määramiseks neile spetsiifilisi detekteerivaid antikehasid, mis seonduvad vaid kindlale patogeenile. *Str. dysgalactiae* pinnavalkude ja inimese IgG Fc fragmendi vahelise afiinsuse kohta otsesed andmed puuduvad, kuid teiste streptokokkide sidumist iseloomustava dissotsiatsioonikonstandi (K_d) väärtus on 2,4 pm [49]. *E. coli* ja *S. aureus* seonduvad välismembraanil leiduva valk A kaudu, vastavad dissotsiatsioonikonstandi väärtused on 10 – 100 nm ning 50 – 200 nm [14].

3.2. *Str. dysgalactiae* biosensori selektiivsus

Selektiivsus on üks kõige olulisemaid biosensorite omadusi. Käesolevas töös konstrueeriti biosensor nii, et seda oleks võimalik integreerida olemasoleva biosensoriga, millega on võimalik üheaegselt määrata ka teisi olulisemaid mastiiti tekitavaid patogeene *S. aureus*, *E. coli* ja *Str. uberis*. Selle eelduseks oli anti-*Str. dysgalactiae* antikeha selektiivsus, mida kontrolliti kõigi kolme eespool nimetatud mastiidipatogeeni suhtes. Mõõtmised tehti kõrgetel bakteri kontsentratsioonidel (10^8 CFU/ml) PBS puhvril, et olla kindel, et teised patogeenid ei sega *Str. dysgalactiae* määramist ka madalamatel kontsentratsioonidel. Kontsentratsioonil 10^8 CFU/ml saadi *Str. uberis* juuresolekul signaaliks $6,5 \pm 2,8$ μ V, *S. aureus* juuresolekul signaaliks $6,5 \pm 2,9$ μ V ja *E. coli* juuresolekul signaaliks $4,2 \pm 1,1$ μ V. Kõik erinevate patogeenide juuresolekul saadud signaalide väärtused ei erinenud oluliselt taustsignaalist ($4,1 \pm 0,8$ μ V) ning jäid määramispiirist allapoole, mistõttu võib järeldada, et disainitud antikeha on selektiivne ning seda on võimalik kasutada *Str. dysgalactiae* üheaegseks määramiseks teiste mastiiti tekitavate patogeenidega.

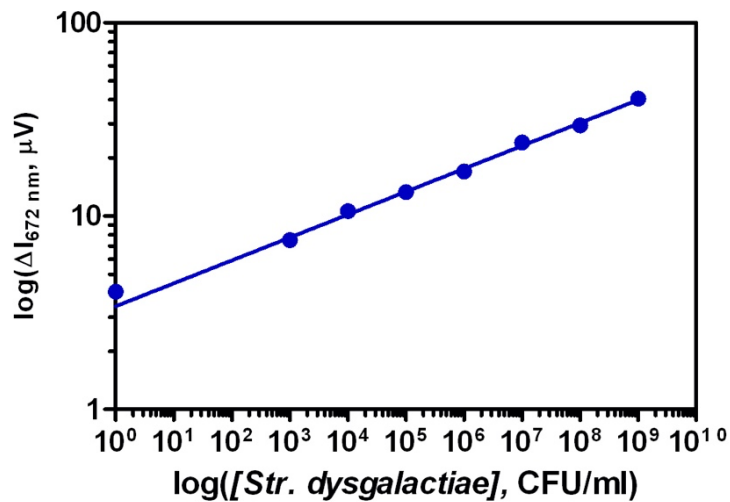
3.3. *Str. dysgalactiae* määramine

Esmalt koostati biosensori kalibreerimisgraafik *Str. dysgalactiae* määramiseks PBS puhvris. Biosensori signaali sõltuvus *Str. dysgalactiae* kontsentratsioonist poollogaritmilises teljestikus on toodud joonisel 6.



Joonis 6. Biosensorsüsteemi signaali sõltuvus *Str. dysgalactiae* kontsentratsioonist 10 mM PBS (pH 7,20; 0,15 M NaCl) puhvris toatemperatuuril

Mõõtmised teostati seitsmel erineval bakteri kontsentratsioonil vahemikus $10^3 - 10^9$ CFU/ml. Eraldi mõõdeti ka biosensorsüsteemi taustsignaal juhul, kui baktereid ei lisatud. Selle väärtus oli $4,1 \pm 0,8 \mu\text{V}$. Biosensori tundlikkuse iseloomustamiseks koostati signaali sõltuvuse graafik patogeeni kontsentratsioonist logaritm-logaritm skaalas (joonis 7).



Joonis 7. Biosensori kalibreerimisgraafik 10 mM PBS (pH 7,20; 0,15 M NaCl) puhvris log-log skaalas

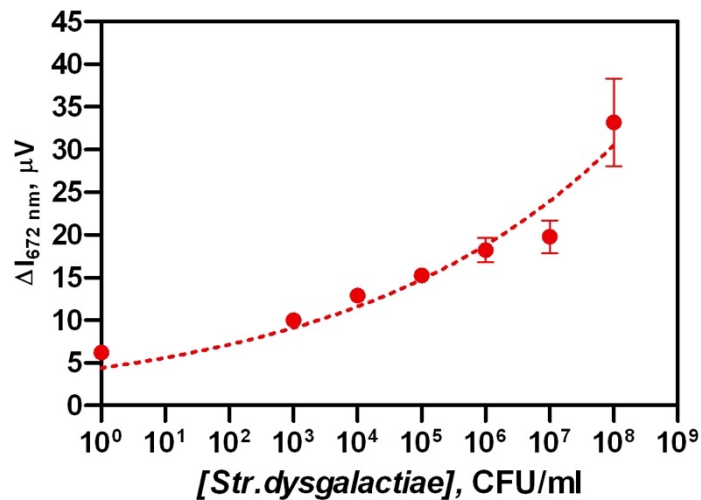
Saadud sõltuvust iseloomustas järgmine võrrand:

$$Y = 10^{(Yvabaliige + t\ddot{o}us * \log(X))} \quad (1)$$

Logaritm-logaritm skaalas koostatud kalibreerimisgraafik oli *Str. dysgalactiae* uuritud kontsentratsiooni vahemikus lineaarne ning selle tõus, mis iseloomustab biosensori tundlikkust, oli $0,119 \pm 0,005 \log(\mu\text{V})/\log(\text{CFU/ml})$. Süsteemi taustsignaalile vastab kalibreerimisgraafiku võrrandi vabaliige, mis oli $0,53 \pm 0,04 \log(\mu\text{V})$. Selle väärtus ($3,4 \pm 1,1 \mu\text{V}$) langeb väga hästi kokku eksperimentaalselt mõõdetud väärtusega $4,1 \pm 0,8 \mu\text{V}$ ($0,61 \pm 0,10 \log(\mu\text{V})$).

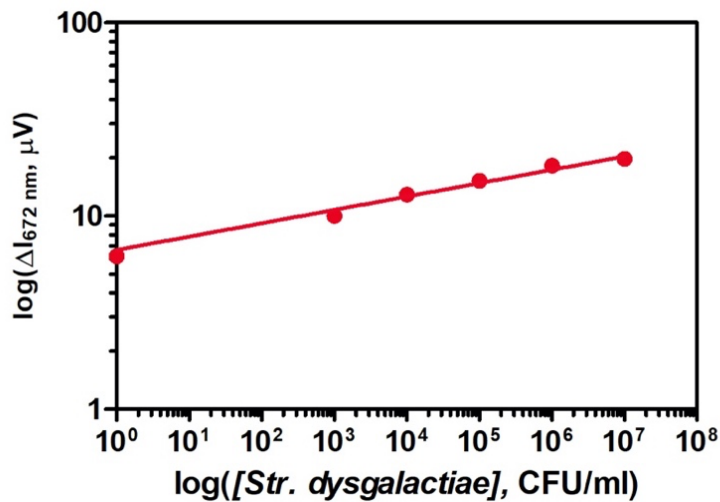
Arvutati ka süsteemi määramispiir LOD (ingl. k. *limit of detection*), liites taustsignaalile kolm taustsignaali standardhälvet, ning kvantifitseerimispiir LOQ (ingl. k. *limit of quantitation*), liites taustsignaalile kümme taustsignaali standardhälvet. LOD väärtuseks saadi $2 \cdot 10^2$ CFU/ml ning LOQ väärtuseks $4 \cdot 10^5$ CFU/ml. Saavutatud määramispiir võimaldab tuvastada patogeene väga madalal kontsentratsioonil, mis on heaks eelduseks väljapakutud biosensori kasutamiseks *Str. dysgalactiae* määramisel.

Biosensori kasutamiseks patogeenide määramisel piimas uuriti ka piima maatriksi mõju biosensori signaalile. Selleks teostati mõõtmised pastöriseerimata piimaga, lisades sellele kindla koguse *Str. dysgalactiae* bakterit. Kuuel erineval bakteri kontsentratsioonil teostati piima maatriksis mõõtmised vahemikus $10^3 - 10^8$ CFU/ml. Biosensori signaali sõltuvus *Str. dysgalactiae* kontsentratsioonist poollogaritmilises teljestikus piima maatriksis on toodud joonisel 8.



Joonis 8. Biosensorsüsteemi signaali sõltuvus *Str. dysgalactiae* kontsentratsioonist piimas

Piima maatriksis määrati samuti ilma bakteri juuresolekuta taustsignaal, mille väärtuseks saadi $6,2 \pm 0,4 \mu\text{V}$. Piima maatriksi taustsignaali väärtus oli natuke kõrgem kui PBS puhvris, kuid see ei sega konstrueeritud biosensoriga *Str. dysgalactiae* määramist.



Joonis 9. *Str. dysgalactiae* määramine piimas biosensoriga log-log skaalas

Sarnaselt PBS puhvrts tehtud mõõtmistele, koostati logaritmi-logaritmi skaalas kalibreerimisgraafik piima maatriksis tehtud mõõtmistele (joonis 9). Piima maatriksis sõltus biosensori signaal *Str. dysgalactiae* kontsentratsioonist lineaarselt vahemikus $10^3 - 10^7$ CFU/ml ning saadud sõltuvuse tõusu väärtuseks oli $0,069 \pm 0,006 \log(\mu\text{V})/\log(\text{CFU/ml})$. Leitud telglõigu väärtus $0,825 \pm 0,037 \log(\mu\text{V})$ ($6,7 \pm 1,1 \mu\text{V}$) kattus eksperimentaalselt määratud taustsignaaliga $6,2 \pm 0,4 \mu\text{V}$ ($0,792 \pm 0,4 \log(\mu\text{V})$). Sarnaselt PBS puhvrts tehtud mõõtmistele leiti LOD ja LOQ väärtused piimas, mille väärtused olid vastavalt 4 CFU/ml ja $6 \cdot 10^3$ CFU/ml. Arvutuste abil leitud LOD väärtus 4 CFU/ml on samas suurusjärgus süsteemi teoreetilise määramispiiriga, mida saab hinnata analüüsitava proovi ruumala alusel, ja mis on 6 CFU/ml, kui proovi ruumala on 150 μl [14]. Piima maatriksis leitud LOD ja LOQ väärtused on oluliselt madalamad kui PBS puhvrts, sest eksperimentaalsete mõõtmiste standardhälbed on väiksemad, ehkki varasemate tulemuste alusel [48] võiks eeldada, et kolloidlahuses (piimas) on valguse hajumine suurem. Kokkuvõtvalt on kalibreerimisgraafikuid iseloomustavad parameetrid toodud tabelis 3.

Tabel 3. Kalibreerimisgraafiku arvutatud parameetrid PBS puhvril ja piima maatriksis

	Kalibreerimisgraafiku tõus	Kalibreerimisgraafiku vabaliige	R²
PBS	0,119 ± 0,005	0,534 ± 0,040	0,973
Piim	0,069 ± 0,006	0,825 ± 0,037	0,950

Str. dysgalactiae määramiseks mastiiti põdevate lehmade piimaproovidest kasutati võrrandit 1, millest patogeeni kontsentratsioon avaldub kui

$$[Str. dysgalactiae] = 10^{\left(\frac{\log(\Delta I) - 0,825}{0,069}\right)} \quad (2),$$

kus ΔI on mõõdetud signaali väärtus.

Konstrueeritud biosensoriga oli võimalik määrata mastiiti põdevate lehmade piimaproovides *Str. dysgalactiae* 21 minutiga. Võrreldes mikrobioloogiliste meetoditega, kus *Str. dysgalactiae* tuvastamiseks kulub üle 3 tunni [20,21,24,31], on konstrueeritud immunobiosensor oluliselt kiirem, mistõttu on selle kasutamisel tulevikus võimalik kiiremini alustada loomade ravi sobivate ravimitega.

3.4. *Str. dysgalactiae* biosensori testimine

Str. dysgalactiae biosensorit testiti patogeeni sisalduse määramiseks mastiiti põdevate lehmade piimaproovides. Kasutades patogeeni kalibreerimisgraafikut piimas (joonis 9), leiti *Str. dysgalactiae* sisaldus proovides. Biosensori signaalide keskmised väärtused analüüsitud piimaproovides ja leitud *Str. dysgalactiae* sisaldus on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Biosensoriga mõõdetud signaalide väärtused ning vastavad *Str. dysgalactiae* sisaldused mastiiti põdevate lehmade piimaproovides

Piima proov	Keskmine signaal, μV	Standardhälve	<i>Str. dysgalactiae</i> sisaldus (CFU/ml)
1	40,2	2,4	$>10^8$ ($2 \cdot 10^{11}$)
2	24,3	4,4	$1,3 \cdot 10^8$

Tabelis 4 toodud andmetest selgus, et *Str. dysgalactiae* sisaldus piimaproovides oli väga kõrge ning oli lähedal varasemalt mastiitsetes piimaproovides leitud *Str. dysgalactiae* maksimaalsetele kontsentratsioonidele [27]. Mikrobioloogiliste külvide meetod andis uuritud piimaproovide puhul positiivse tulemuse, st *Str. dysgalactiae* sisaldus oli $>4 \cdot 10^2$ CFU/ml, kuid kahjuks ei olnud *Str. dysgalactiae* sisaldust määratud kvantitatiivselt. Saadud andmete alusel võib järeldada, et biosensor on kasutatav *Str. dysgalactiae* määramiseks mastiiti põdevate loomade piimas, kuid kvantitatiivsete võrdluste tegemiseks oleks uuritavates piimaproovides lisaks vaja teha täiendavaid kvantitatiivseid mikrobioloogilisi määramisi või PCR analüüse.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli konstrueerida antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhinev biosensorsüsteem mastiiti põhjustava patogeeni *Str. dysgalactiae* määramiseks ning testida selle kasutatavust reaalseste piimaproovide analüüsimisel.

Konstrueeritud immunobiosensor oli integreeritud graanulisestusanalüüsi süsteemiga, millega viidi läbi ühekordse mikrokolonniga mõõtmised. *Str. dysgalactiae* sidumiseks kasutatava mikrokoloni jaoks valmistati inimese IgG Fc fragmendiga aktiveeritud Sephadex G-50 geel. Seondunud *Str. dysgalactiae* detekteerimiseks kasutati originaalset anti-*Str. dysgalactiae* antikeha, mis oli konjugeeritud DyLight® 650 fluorestsents markeriga.

Töö käigus kontrolliti disainitud antikeha selektiivsust kolme olulisema mastiiti põhjustava patogeeni suhtes. Selgus, et *S. aureuse*, *E. coli* ja *Str. uberis* juuresolekul mõõdetud signaalid jäid biosensori määramispiirist allapoole. Koostati kalibreerimisgraafikud *Str. dysgalactiae* määramiseks PBS puhvris ja piimamaatriksis, mis olid log-log skaalas lineaarsed *Str. dysgalactiae* kontsentratsiooni vahemikus $10^3 - 10^7$ CFU/ml. Biosensori määramispiir PBS puhvris oli $2 \cdot 10^2$ CFU/ml ja piimas 4 CFU/ml. Töö tulemustest selgus, et piima maatriks ei mõjuta *Str. dysgalactiae* määramist biosensoriga. *Str. dysgalactiae* määramiseks proovides kulus 21 minutit.

Str. dysgalactiae biosensorsüsteemi testiti mastiiti haigestunud lehmadel kogutud piimaproovides. Analüüsi tulemused näitasid väga kõrgeid *Str. dysgalactiae* sisaldusi, mis olid kooskõlas mikrobioloogiliste külvide tulemustega.

Välja pakutud *Str. dysgalactiae* biosensorit on võimalik integreerida olemasoleva biosensorsüsteemiga, millega saab automaatselt ja samaaegselt määrata olulisemaid mastiiti põhjustavaid patogeene piimas.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. S.A.M. Martins, V.C. Martins, F.A. Cardoso, J. Germano, M. Rodrigues, C. Duarte, R. Bexiga, S. Cardoso, P.P. Freitas, Biosensors for On-Farm Diagnosis of Mastitis, *Front Bioeng Biotechnol.* 7 (2019) 186–186.
2. A. de Jong, F.E. Garch, S. Simjee, H. Moyaert, M. Rose, M. Youala, E. Siegwart, Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results, *Veterinary Microbiology.* 213 (2018) 73–81.
3. P. Kalmus, T. Kramarenko, M. Roasto, K. Meremäe, A. Viltrop, Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia, *Food Control.* 51 (2015) 135–139.
4. A. El-Sayed, W. Awad, N.-E. Abdou, H.C. Vázquez, Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens, *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* 5 (2017) 89–97.
5. Veterinaar- ja Toidulaboratoorium. <https://www.vetlab.ee/et> viimati alla laaditud 20.10.2020.
6. P.R.F. Adkins, J.R. Middleton, Methods for Diagnosing Mastitis, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 34 (2018) 479–491.
7. H. Jamali, H.W. Barkema, M. Jacques, E.-M. Lavallée-Bourget, F. Malouin, V. Saini, H. Stryhn, S. Dufour, Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows, *Journal of Dairy Science.* 101 (2018) 4729–4746.
8. M. Abdelsalam, M. Fujino, A.E. Eissa, S.C. Chen, M. Warda, Expression, genetic localization and phylogenic analysis of NAP1r in piscine *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* isolates and their patterns of adherence, *Journal of Advanced Research.* 6 (2015) 747–755.
9. V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, M. Braunstein, J.I. Rood, *Gram-positive pathogens*, John Wiley & Sons, 2019.
10. M. de S.R. Mioni, F.F.C. Castro, L.Z. Moreno, C.M. Apolinário, L.D. Belaz, M.G. Peres, B.L.D. Ribeiro, M.J. da S. Castro, A.M. Ferreira, A. Cortez, A.M. Moreno, M.B. Heinemann, J. Megid, Septicemia due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* in vampire bats (*Desmodus rotundus*), *Scientific Reports.* 8 (2018) 9772.
11. Hardy Diagnostics.
https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Streptococcus.htm viimati alla laaditud 29.11.2020.

12. C.S. Petersson-Wolfe, J.F. Currin, *Streptococcus dysgalactiae*: A Practical Summary for Controlling Mastitis, (2012).
13. L.F. Calvino, R.A. Almeida, S.P. Oliver, Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis, *Veterinary Microbiology*. 61 (1998) 93–110.
14. D. Juronen, Ave Kuusk, K. Kivirand, A. Rincken, T. Rincken, Immunosensing system for rapid multiplex detection of mastitis-causing pathogens in milk, *Talanta*. 178 (2018) 949–954.
15. T.F. Landers, B. Cohen, T.E. Wittum, E.L. Larson, A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential, *Public Health Rep.* 127 (2012) 4–22.
16. M.T. Madigan, K.S. Bender, D.H. Buckley, W.M. Sattley, D.A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson, 2018.
17. B. Priyanka, R.K. Patil, S. Dwarakanath, A review on detection methods used for foodborne pathogens, *Indian J Med Res.* 144 (2016) 327–338.
18. K.L.M. Moran, J. Fitzgerald, D.A. McPartlin, J.H. Loftus, R. O’Kennedy, Chapter 4 - Biosensor-Based Technologies for the Detection of Pathogens and Toxins, in: V. Scognamiglio, G. Rea, F. Arduini, G. Palleschi (Eds.), *Biosensors for Sustainable Food - New Opportunities and Technical Challenges*, Elsevier, 2016: pp. 93–120.
19. P. Cremonesi, V. Monistero, P. Moroni, A. Barberio, R. Almeida, A.A. Latorre, B. Castiglioni, Main Pathogens Detected in Milk, in: *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2020.
20. R. Riffon, K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, J. Lagacé, Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR, *J Clin Microbiol.* 39 (2001) 2584–2589.
21. B. Cressier, N. Bissonnette, Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk, *Journal of Dairy Science.* 94 (2011) 2171–2184.
22. M. Ziyaina, B. Rasco, S.S. Sablani, Rapid methods of microbial detection in dairy products, *Food Control.* 110 (2020) 107008.
23. ThermoFisher. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/industrial/animal-health/bovine-cattle-diagnostic-solutions/bovine-diseases/bovine-mastitis.html> viimati alla laaditud 20.05.2021.
24. DNA Diagnostic. <https://dna-diagnostic.com/products/mastitis/> viimati alla laaditud 25.04.2021.

25. Eesti Põllumajandusloomade Jõudluskontroll.
<https://www.epj.ee/jkk/piimaveised/piimaveiste-joudluskontrolli-lisateenused/mastiit-16.html>
 viimati alla laaditud 16.05.2021.
26. M. Parida, S. Sannarangaiah, P.K. Dash, P.V.L. Rao, K. Morita, Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases, *Rev Med Virol.* 18 (2008) 407–421.
27. A. Gey, C. Werckenthin, S. Poppert, R.K. Straubinger, Identification of pathogens in mastitis milk samples with fluorescent in situ hybridization, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 25 (2013) 386–394.
28. G. Vrioni, C. Tsiamis, G. Oikonomidis, K. Theodoridou, V. Kapsimali, A. Tsakris, MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives, *Ann Transl Med.* 6 (2018) 240–240.
29. J.R. Barreiro, J.L. Gonçalves, P.A.C. Braga, A.G. Dibbern, M.N. Eberlin, M.V. dos Santos, Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of Dairy Science.* 100 (2017) 2928–2934.
30. The Microbiology Network <http://microbiologynetwork.com/counting-colonies.asp>
 viimati alla laaditud 20.05.21.
31. S.P. Oliver, B.E. Gillespie, B.M. Jayarao, Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting, *FEMS Microbiology Letters.* 160 (1998) 69–73.
32. D. Wang, Y. Liu, Development of Primer Sets for Loop-Mediated Isothermal Amplification that Enables Rapid and Specific Detection of *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae*, *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 12 (2015) 5735–5742.
33. K.-H. Lee, J.-W. Lee, S.-W. Wang, L.-Y. Liu, M.-F. Lee, S.-T. Chuang, Y.-M. Shy, C.-L. Chang, M.-C. Wu, C.-H. Chi, Development of a Novel Biochip for Rapid Multiplex Detection of Seven Mastitis-Causing Pathogens in Bovine Milk Samples, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 20 (2008) 463–471.
34. P.A.C. Braga, J.L. Gonçalves, J.R. Barreiro, C.R. Ferreira, T. Tomazi, M.N. Eberlin, M.V. Santos, Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 38 (2018) 586–594.

35. N.A. Jahan, S.M. Godden, E. Royster, T.C. Schoenfuss, C. Gebhart, J. Timmerman, R.C. Fink, Evaluation of the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system in the detection of mastitis pathogens from bovine milk samples, *Journal of Microbiological Methods*. 182 (2021) 106168.
36. F. Mollarasouli, S. Kurbanoglu, S.A. Ozkan, The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis, *Biosensors*. 9 (2019).
37. J. Riu, B. Giussani, Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 126 (2020) 115863.
38. M. Rubab, H.M. Shahbaz, A.N. Olaimat, D.-H. Oh, Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food, *Biosensors and Bioelectronics*. 105 (2018) 49–57.
39. G. Vásquez, A. Rey, C. Rivera, C. Iregui, J. Orozco, Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*, *Biosensors and Bioelectronics*. 87 (2017) 453–458.
40. C. Duarte, T. Costa, C. Carneiro, R. Soares, A. Jitariu, S. Cardoso, M. Piedade, R. Bexiga, P. Freitas, Semi-Quantitative Method for Streptococci Magnetic Detection in Raw Milk, *Biosensors*. 6 (2016).
41. R. Ghasemi, S.Z. Mirahmadi-zare, M.H. Nasr-Esfahani, A. Allafchian, M. Behmanesh, Optical biosensing of *Streptococcus agalactiae* based on core/shell magnetic nanoparticle-quantum dot, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 411 (2019) 6733–6743.
42. A. Ahmed, J.V. Rushworth, J.D. Wright, P.A. Millner, Novel Impedimetric Immunosensor for Detection of Pathogenic Bacteria *Streptococcus pyogenes* in Human Saliva, *Anal. Chem*. 85 (2013) 12118–12125.
43. P.-H. Chang, C.-C. Weng, B.-R. Li, Y.-K. Li, An antifouling peptide-based biosensor for determination of *Streptococcus pneumoniae* markers in human serum, *Biosensors and Bioelectronics*. 151 (2020) 111969.
44. N. Malinowska, W. Białobrzaska, T. Łęga, K. Pałka, K. Dziąbowska, S. Żołądowska, E. Czaczyk, K. Pala, D. Nidzworski, Antibody Modified Gold Electrode as an Impedimetric Biosensor for the Detection of *Streptococcus pyogenes*, *Sensors*. 20 (2020).
45. X. Shi, F. He, Y. Lian, D. Yan, X. Zhang, A new aptamer/SWNTs IDE-SPQC sensor for rapid and specific detection of Group A *Streptococcus*, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 198 (2014) 431–437.

46. Ruzicka J. CD-ROM: 4th Edition of Flow Injection Analysis. 2009.
47. Sigma Aldrich.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge17004301?lang=en®ion=EE>
viimati alla laaditud 12.05.2021.
48. D. Peedel, T. Rinken, Rapid biosensing of Staphylococcus aureus bacteria in milk, Anal. Methods. 6 (2014) 2642–2647.
49. P. Nitsche-Schmitz, H. Johansson, I. Sastalla, S. Reissmann, I.-M. Frick, G. Chhatwal, Group G Streptococcal IgG Binding Molecules FOG and Protein G Have Different Impacts on Opsonization by C1q, The Journal of Biological Chemistry. 282 (2007) 17530–6.

SUMMARY

Biosensing system for the detection of *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae is one of the major environmental pathogens causing bovine mastitis. Therefore, rapid pathogen detection is of crucial importance for effective treatment of animals and reduction of economic losses. Currently pathogens are detected with time-consuming methods like microbiological culturing and colony counting, or lately with molecular genetic methods. Biosensors are a good alternative to reduce analysis time and carry out on-site analysis, allowing to start timely and focused treatment of infected animals.

The aim of the present work was to develop an antigen-antibody based biosensor system for the detection of *Streptococcus dysgalactiae* and test this biosensor in real milk samples.

To construct the biosensor, Sephadex G-50 Medium gel was activated with human immunoglobulin G Fc fragment. *Str. dysgalactiae* bacteria from milk samples were captured on the bioactivated beads and detected with specially designed anti-*Str. dysgalactiae* antibody labelled with fluorescence marker DyLight® 650. The formed antigen-antibody complex was detected by fluorescence signal at wavelength 672 nm. The constructed biosensor was integrated with the bead injection analysis system.

The selectivity of the anti-*Str. dysgalactiae* antibody towards three major mastitis pathogens was studied, and the obtained results indicated no cross-reactivity pathogens' concentrations up to 10^8 CFU/ml. The linear working range of the constructed biosensor in milk was between 10^3 and 10^7 CFU/ml and its detection limit 4 CFU/ml. The time of analysis was 21 min.

The constructed biosensor was tested in real milk samples, collected from cows suffering from *Str. dysgalactiae* caused mastitis.

The constructed biosensor can be integrated with the existing biosensing system for the automated multiplex detection of mastitis-causing pathogens in milk.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maria Mängel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
Biosensorsüsteem *Streptococcus dysgalactiae* määramiseks

mille juhendajad on Toonika Rinken ja Delia Peedel,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **04.06.2026** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Maria Mängel
26.05.2021