

Utveckling av snabbtest för diagnostik i fält av inflammatoriskt tillstånd hos häst

Projektansvarig
Anki Koch-Schmidt
Högskolan i Kalmar
391 82 Kalmar

Projekt mål

Projektets mål var att utveckla ett enkelt, hållbart, tillförlitligt och för lekman lättanvänt diagnostisk test för att i fält snabbt kunna avgöra om ett inflammatoriskt tillstånd föreligger hos häst. Testet skulle baseras på bestämning av plasmaproteinet SAA, serum amyloid A (*Equus callabus*) med användande av specifika antikroppar riktade mot detta protein.

Resultat

Olika testsystem för analys av serum amyloid A, SAA, från häst, baserade på immunkemiska reaktioner, har utvecklats. SAA-proteinet återfinns i tre isoformer och kan även variera något mellan olika hästraser. Dock skall utvecklade test kunna fungera för samtliga dessa då de baseras på en blandning av antikroppar riktade mot olika hästSAA, vilka framställts med rekombinant teknik, samt mot syntetiskt framställda SAA fragment gemensamma för samtliga raser.

Två av de beskrivna testsystemen är tänkta att prövas under våren-sommaren 2009 av olika målgrupper (travtränare, veterinärer, m.fl.) samt standardiseras mot existerande SAA-analyser. Därefter skall testen få sin slutliga utformning med målet att de skall kunna lanseras på marknaden under senare delen av 2009.

För framtida produktion av anti-hästSAA som erfordras i testsystemen har en större pool av DNA för rekombinanta former av hästSAA tagits fram och finns lagrade. Vidare kommer ett företag att ställa upp med erforderlig antikroppsframställning och diskussioner pågår med ytterligare ett för produktion av sensorenhet och marknadsföring.

BAKGRUND

Serum amyloid A och inflammationsstatus hos häst

Serum amyloid A är ett HDL(High density lipoprotein)-bundet sk akut fasprotein, som ökar markant i samband med inflammation hos de flesta däggdjur och vars bildning, framför allt i levern, ökar efter stimulering med interleukin 1 och 6 samt tumörnekrosfaktor alfa (1-3).

Hos häst, *Equus caballus*, uppvisar ett nyfött friskt föl relativt höga plasmanivåer av SAA under den första levnadsveckan. Halten sjunker dock successivt och ett ettårigt föl uppvisar en plasmanivå som överensstämmer med en kliniskt frisk adult hästs på $\leq 15 \mu\text{g/mL}$. Likaså uppvisar ett friskt sto i samband med partum förhöjd SAA nivå med en topp omkring tredje dagen för att sedan ha återfått ett normalvärde ca en månad *post partum*.

Vid viralt eller bakteriellt orsakad inflammation eller experimentellt inducerad aseptisk inflammation hos häst ökar plasmakoncentrationen av SAA från 40 upp till 200 gånger inom några timmar och når en maximal titer vanligen mellan 24 och 48 timmar efter stimulusinitiering (4-5). SAA är därmed det mest dominerande akuta fasproteinet hos häst. Plasma clearance är dock hög för SAA och dess halt sjunker i takt med att inflammationen försvinner. Efter en operation är nivån nere på normal nivå efter ca en vecka. I vissa fall kan dock ett bifasiskt mönster uppvisas med topp även på 4:e till 5:e dagen (6). Dessa karakteristika gör att SAA är en utmärkt markör för inflammationens aktivitet.

SAA analys kan således nyttjas för diagnostik av inflammation hos häst. Utöver detta, kan SAA halten spegla hur allvarlig inflammationen är och därmed även prognosen. Inflammation i skelett-muskelsystemet, i lufvägarna, i gastrointestinala systemet och i reproduktionsorganen åtföljs alla av starkt förhöjda SAA-nivåer (4, 7-11). Vidare kan förutom leverceller även celler i leder och i mjölkkörtlar utsöndra SAA vid inflammation, vilket kan nyttjas för diagnostik, prognos och behandling (12-13).

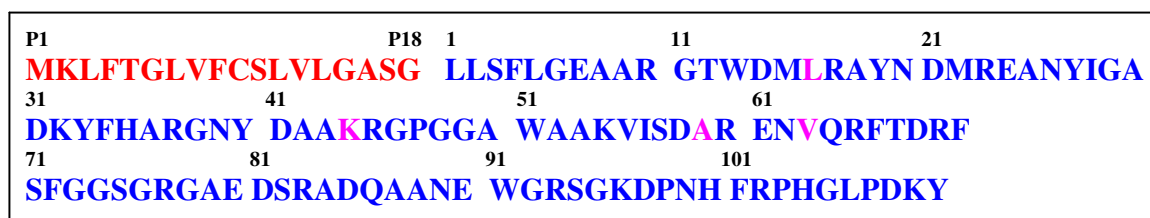
Analys av SAA görs idag på specifika laboratorier och av utbildad personal, vilket gör att ett SAA svar kan dröja mellan 1-3 dagar. Av ovanstående framgår att det skulle vara mycket värdefullt om ett SAA svar kunde erhållas en kort stund efter provtagningen. Vidare skulle det vara värdefullt om även icke laboratoriepersonal skulle kunna utföra testet och dessutom i fält – av ex. en veterinär, en travtränare eller stuteriägare.

I föreliggande projekt har rekombinant SAA framställts för produktion av specifika antikroppar, anti-SAA, för utveckling av snabbtest för ovanstående nämnda behov. Framställda antikroppar är polyklonala och riktade mot olika delar av SAA-proteinet men även mot olika varianter av SAA hos häst. Ett antal enkla testsystem, som beskrivs nedan, har utvecklats. Två alternativt tre av dessa kommer att testas i en första provomgång av målgrupper under kommande vår/sommar, för att kunna utvecklas till slutlig produkt.

Serum amyloid A hos häst

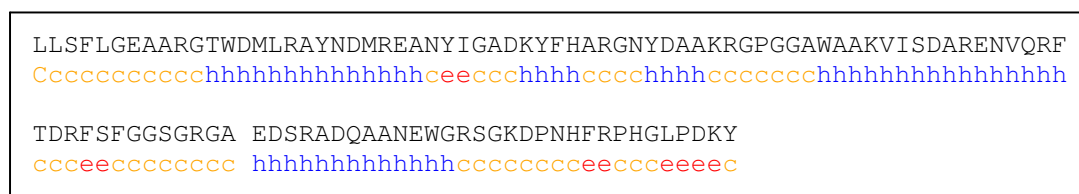
SAA är ett litet (110 aa) HDL-bundet protein, vars exakta roll är relativt okänd. Då den ökar i samband med inflammation fyller den sannolikt en funktion i immunförsvaret, troligen via den G-proteinkopplade receptorn FPRL1. Den synes även främja frisättandet av kolesterol från vävnadsceller och överföring av kolesterolet som kolesterolester till HDL.

SSA-cDNA från hästlever har molekylärt klonats och sekvensbestämts (14). Nyare sekvenseringar visar att cDNA och därmed aminosyrasekvensen kan skilja i några positioner mellan olika sidoformer och hästraser (15), figur 1. Open reading frame utgörs av 387 nukleotider och kodar för en SSA prekursor på 128 aminosyror, figur 1. De 18 N-terminala aminosyrorna utgör signalsekvensen, som ej återfinns i utsöndrat protein.



Figur 1. Aminosyrasekvensen av prekursor SAA från häst. P1-P18 utgör signalsekvensen och återfinns ej i funktionellt plasmaprotein. Aminosyra 16, 44,59 och 63 kan variera mellan olika isoformer och hästraser.

Enligt figur 1 finner man hög andel hydrofoba aminosyror i proteinets N-terminala del, vilken visat sig vara den del av proteinet som binder till HDL:s lipidhölje. Dessa medför även aggregatbildning av fritt SAA (16-17). I proteinets C-terminala del återfinns däremot hög andel laddade och hydrofila aminosyror samtidigt som prolin förekommer med jämna mellanrum. Denna del av proteinet saknar därför helixstruktur, figur 2, och är troligen exponerad mot omgivande vattenlösning. Aminosyrorna 85-92 är unika för häst-SSA då de saknas i övriga däggdjurs SAA. Dessa aminosyror bildar en peptidögla med sk extended strands i proteinet, figur 2. Tredimensionell struktur är ej bestämd för proteinet.



Figur 2. Tänkbar sekundär struktur hos häst SAA baserad på aminosyrasekvensen. c: random coil; h: helix, e: strand .

Strategi för utveckling av test för analys av SAA i hästplasma

Då antikroppsbaseade analyser uppvisar hög specificitet, stor känslighet och kan göras enkla, dvs utan mera komplicerad mätutrustning, valdes immunkemisk analysteknik för utveckling av testet.

För att kunna producera antikroppar för diagnostik av SSA-halten i hästblod krävs som antigen ett SAA helt fritt från andra hästplasmaproteiner och -komponenter. Sådant SAA kan erhållas genom rekombinant DNA teknik och expression i exempelvis bakterier samt genom syntes enligt Merrifield av SAA-peptider. Strategin var således att framställa rekombinant hästSAA men även specifika SAApeptidsekvenser, vilka sedan skulle nyttjas som antigen för framställning av polyklonala antiSAA.

Målet för testen var att de skulle kunna nyttjas i fält av icke laborativt utbildade personer men samtidigt ge mycket tillförlitliga resultat. Ett antal sådana testsystem, baseade på immunkemisk teknik, finns idag på marknaden för analys av bl.a. proteiner. I föreliggande projekt prövas några av dessa samtidigt som även nya ideer till testsystem utvecklas.

Då SAA i hästplasma förekommer bl.a. bundet till HDL skall provet utgöras av helblod/plasma. Endast små mängder blod erfordras. Dock rekommenderas veterinär att venöst blod från *vena jugularis* till EDTA rör tas för analysen.

MATERIAL OCH METODER

Upprening av SAA från hästblod för antikroppsframtagning och som referens

SAA uppenades enligt Hultén et al., 1997 från hästblod (erhållet genom Lena Söderberg, ATG Hästklirik, Kalmartravet, Kalmar) från hästar som uppvisat inflammatoriskt tillstånd. Upprenat SAA nyttjades för framställning av polyklonala anti-SAA från kanin.

Framställning av rekombinanta former av SAA (r-SAA)

cDNA för bildning av rekombinanta former av nativt och modifierat hästSAA framställdes genom att successivt addera och med PCR förlänga specialdesignade DNA-sekvenser. DNA-sekvenserna beställdes från TAG (Copenhagen, Dk) och syntetiserat cDNA sekvenserades av MWG (Martinsried, Tyskland).

Korrekta sekvenser inserterades i pET32a+ (Novagen) och uttrycktes i IPTG stimulerad *B121trx* (*E. coli*) (Novagen) vid 25 °C under 6-8 timmar.

Uttryckta proteiner uppenades med affinitetskromatografi i de fall de hade en HIS-tag i N-terminal del alternativt med konventionell kromatografi (jonbytare följd av HIC och gelfiltrering) för nativt SAA. Upprenat protein analyserades med SDS-PAGE och Western blot.

Framställning av peptidsekvenser av SAA

C-terminal sekvens av SAA liksom den för hästSAA specifika loopen framställdes med konventionell peptidsyntes enligt Merrifield.

Produktion av anti-eSAA och anti-reSAA

Upprenat SAA från hästplasma (e-SAA1 och eSAA2) injicerades tillsammans med Freund's complete adjuvant för framställning av polyklonala antikroppar. Dessa, anti-eSAA1 och anti-eSAA2, nyttjades för ELISA och WB analys av rekombinant SAA. Antikroppar mot rekombinant SAA, anti-reSAA3 och anti-reSAA4 respektive mot eSAA-peptid, anti-reSAA5-loop, framställdes på motsvarande sätt och nyttjades för utveckling av testsystem. För närvarande och framledes producerar Innovagen AB antikropparna.

Utveckling av testsystem

För nedan beskrivna testsystem nyttjades dels uppenat SAA från hästblod men även hästplasma.

ELISA

Elisa-kit i form av sandwichELISA utformades genom att vid pH 9,5 coata high adsorbing ELISA-brunnar med anti-C-terminal SAA, blockera med BSA, binda SAA (hästplasma) och därefter tillsätta nästa anti-SAA (ex. anti-reSAA4) till vilken en anti-rabbit-IgG-HRP tillsattes. Efter tillsats av väteperoxid och ABTS (2,2'-azino-bis [3-ethylbenziazoline-6-sulfonic acid) mättes absorbansen vid 510nm.

Dot-blot analys

Anti-SAA applicerades på utstansat nitrocellulosamembran placerat i en brunn i en odlingsplatta. Efter intorkning adderades en lösning med BSA (Bovint serum albumin) som blockerade proteinbindande sites. Därefter tillsattes enzymmärkt anti-SAA. Efter 5 minuter avlägsnades överskottet av antikroppar och en kort tvätt genomfördes varefter tillsats av substrat för bildning av färgad produkt gjordes. Bildad produkt kan analyseras med blotta ögat.

Immunkromatografiska test – sk strips

Remсор av Whatman cellulosa papper behandlades med 0,1M natriummetaperjodat under en timme, varefter papperet torkades efter att ha tvättats noggrant i destvatten. Därefter doppades papperet i en antikroppslösning (1µg anti-C-terminalSAA/mL 0,1 karbonatbuffert, pH 9,5) och inkuberades under 1 timme. Efter noggrann tvätt i PBS torkades remsan. Remsan doppades sedan i SAA-prov även innehållande glukosoxidas samt SAA-C-terminal-HRP. Efter 10 minuter doppades remsan i en framkallningslösning innehållande glukos och ett kromogen, ex. 4-klor-1-naftol.

Turbidimetrisk analys

SAA i koncentrationsintervallet 5 – 200 µg/mL titrerades med polyklonal anti-reSAA 3 i PBS och bildade komplex analyserades vid 610 nm samt i turbidometer.

Turbidimetrisk analys med färgade antikroppar

Ett testsystem som nyttjar antikroppar uppboundna till en färgad polymer nyttjades för att skapa agglutination. SAA-proteinet utgör bryggan och aggregaten kan även ses med blotta ögat.

Agglutinationstest med kulformad polymer

Kulformad kolhydratpolymer aktiverades med CNBr (50mg/g gel) vid pH 11,0, varefter antikroppar immobiliserades på kulorna i 0,1M NaCO₃-buffert, pH 8,1.

RESULTAT OCH DISKUSSION

Upprening av SAA från hästplasma och framställning av polyklonala anti-SAA

SAA upprengades enligt Hultén et al., 1997 med vissa modifieringar och nyttjades därefter för framställning av polyklonalt serum från kanin. Bildade antikroppar kunde dock ej nyttjas för diagnostik av SAA då framtaget SAA inkluderade andra plasmaproteiner, mot vilka antikroppar också kunde ha bildats. Däremot kunde anti-SAA fungera väl för analys av rekombinant framställt SAA.

Framtagning av rekombinanta former av eSAA

För framställning av rekombinant protein utgår man vanligen från de celler som normalt producerar proteinet. I föreliggande fall skulle enligt ansökan hästlever ha nyttjats för framtagning av totalRNA med på följande cDNA syntes. Dock visade det sig vara svårt att få tillgång till hästlever. Därför och med kännedom om cDNA sekvensen för hästSAA designades ett antal nukelotidsekvenser för syntes av cDNA SAA. Detta sätt att producera cDNA för önskade SAA former visade sig mycket lyckat och samtliga cDNA hade korrekt sekvens.

Då nativt liksom rekombinant SAA motsvarande nativ struktur är problematiskt att upprena på grund av sin hydrofoba N-terminal, som normalt ligger nerbäddad i HDL-partikelns lipidskikt, framställdes även rekombinanta former av SAA som hade en mera hydrofil N-terminal utan att detta skulle påverka resterande struktur (testat genom sekundärstrukturanalys). Dessa visade sig också enkla att såväl uttrycka i bakterier som att upprena.

En pol av bakterier innehållande pET32a+ plasmid med inserterat cDNA för olika former av hästSAA har producerats för framtida behov och förvaras vid -75 °C.

Produktion av antikroppar mot SAA och dessas egenskaper

Antikroppar har under projektets gång producerats från olika framställda rekombinanta SAA-antigener. Då dessas expression liksom upprening hela tiden förbättrats i projektet har även erhållna antikroppar fått bättre egenskaper för testsystemen. Ett antal antikroppar, riktade mot olika rekombinanta former och syntetiskt framställda sekvenser och producerade av Innovagen AB i Lund, kommer nu att användas i testen som då bör kunna nyttjas för olika hästraser.

Antikropparna är samtliga sk polyklonala antikroppar, men då antigenet i vissa fall utgörs av peptidsekvenser är de väl definierade mot en specifik determinant och uppträder därmed i princip som en monoklonal antikropp.

En viktig egenskap hos bildade antikroppar är hur stabila antigen-antikroppskomplex de bildar, dvs vilket K_D värde som uppvisas för komplexet. K_D värdena har bestämts genom jämviktsdialys och uppvisar värden omkring 10⁻⁹ M vilket får anses acceptabelt. Ju lägre värde, ju känsligare kan metoden göras. Antikropparna har även

uppvisat god lagringsstabilitet, vilken dock sannolikt kan ytterligare förbättras genom tillsats av ex andra proteiner eller salter.

Evalvering av utvecklade testsystem

ELISA eller liknande analyssystem

Några enzymbaserade immunkemiska analyser prövades, ex sandwichELISA. Känsligheten visade sig hög och SAA kunde mätas ner till ng/mL nivå. Det hästserum som erhållits från inflammerade hästar fick således spädas åtskilligt innan tillförlitlig analys kunde genomföras. Halten SAA hos inflammerade hästar varierade från ca 200 µg/mL till ca 870 µg/mL.

Nackdelen med ELISA-metoden är att den omfattar flera steg, bl.a. ett tvättsteg för att avlägsna icke bundna enzymerkäta antikroppar. Den kunde dock utföras med tillförlitliga resultat inom en timme. Bärbara elisadetektorer finns idag på marknaden. Då en färgad produkt bildas kan ett positivt svar enkelt ses med blotta ögat, men exakt bestämning av SAA halten är osäker.

Likaså involverar dot-blot tekniken ett tvättsteg som kan bli komplicerat att genomföra i testet. Metoden är även endast semikvantitativ.

Immunkromatografiska testsystem

Sedan 1970-talet finns på marknaden ett antal immunkromatografiska testsystem för analys av specifika proteiner, virus, bakterier, parasiter, etc. Fördelen med dessa är att de är snabba, lagringståliga samt kan nyttjas av icke laborativt utbildad personal. Utformningen av testen varierar men viktiga komponenter är specifika antikroppar och specifika enzymer, vilka kan omvandla ett substrat så att en färgad och lätt synbar produkt kan bildas.

Ett enkelt testsystem utvecklades baserat på anti-SAA och en till plasmaSAA konkurrerande SAA-peptid. Detektionen gjordes genom att studera omvandlingen av ett substrat till färgad produkt med ett 2-enzymssystem (glukosoxidas-peroxidas). Längden på den uppkomna färgade stapeln på remsan är proportionell mot koncentrationen av SAA. Testet bedöms dock vara en viktig kandidat för beskrivet ändamål och skall därför utvecklas vidare och optimeras. Mängden konkurrerande SAA peptid avgör detektionsnivån.

Antigen-antikroppskomplex och turbidometrisk analys

SAA är ett antigen som har flera determinanter till vilket olika antikroppar, sk polyklonala antiSAA kan binda. Då antalet mol antigen motsvarar antalet mol antikropp fås aggregatbildning och utfällning. Mängden utfällt antigen-antikroppskomplex är proportionellt mot antigenhalten. I föreliggande projekt studerades utfällningen dels spektrofotometriskt och dels turbidometriskt och halter av SAA ner till ca 10µg/mL kunde analyseras. Tekniken skulle således vara applicerbar för bestämning av SAA, då halterna av SAA hos inflammerade hästar ligger långt över denna undre detektionsgräns.

Företaget HemoCue har utvecklat ett system för analys av humana plasmaproteiner som mycket väl skulle kunna appliceras på SAA. Mätinstrumentet är portabelt och lätthanterligt och endast en liten mängd (<20µL) erfordras.

Bildning av färgade aggregat av antigen-antikroppskomplex

En alternativ metod för analys av bildade antigen-antikroppskomplex har utvecklats och prövats och baseras på färgade antikroppar genom att dessa bundits upp till en

färgad men löslig polymer. Metoden är inte färdigutvecklad än men hitintills gjorda försök visar att bildade komplex skulle kunna analyseras med blotta ögat alternativt med liten portabel spektrofotometer med fast våglängd.

Vidare har uppbindning av antikropp till kulformade kolhydratpolymerer prövats. Även här kan aggregat observeras och således positiva resultat lätt detekteras med blotta ögat. Dock är kvantitativ bestämning av SAA osäker.

SAMMANFATTNING

Ett antal antikroppsbaseade analysystem har designats och utvecklats för analys av SAA från hästserum. Störst potential att kunna fylla de uppställda kraven har testsystemet baserat på immunkromatografi och testsystemet baserat på bildning av ett antigen-antikroppsaggregat, ofärgade eller färgade. Dessa två system kommer att utvecklas vidare av projektansvarig och standardiseras (i samverkan med leg vet. Lena Söderberg, Kalmar) under våren 2009. Därefter sänds de ut till olika målgrupper för en testomgång.

Projektet kommer således att drivas vidare till dess att slutlig produkt uppnås.

REFERENSER

1. Dinarello, C.A., Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response, *New Engl.J. Med.*, 1984, 311, 1413-1418.
2. Heinrich, P.C., Castell, J.C., and Andus, T., Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.*, 1990, 265, 621-36.
3. Beutler, B., and Cerami, A., Cachectin/Tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol. Res.*, 1986, 5, 281-293.
4. Nunokawa, Y., Fujinaga, T., Taira, T., Okumura, M., Yamashita, K., Tsunoda, N., and Hagio, M., Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses, *J. Vet. Med. Sci.*, 1993, 55, 1011-1016.
5. Satoh, M., Fujinaga, T., Okumura, M., and Hagio, M., Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of serum amyloid A protein in horses, *Am. J. Vet. Res.*, 1995, 56, 1286-1291.
6. Hultén, C., Tulamo, R.-M., Suominen, M.M., Burvall, K., Marhaug, G., and Forsberg, M., A non-competitive chemiluminescence immunoassay of the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999, 68, 267-281.
7. Hultén, C., Sandgren, B., Skioldebrand, E., Klingeborn, B., Marhaug, G and Forsberg, M., The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection, *Acta Vet Scand.*, 1999, 40, 232-333.

8. Vandenplas, M.L., Moorre, J.N., Barton, M.H., et al., Concentration of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic, *Am. J. Vet. Res.*, 2005, 66, 1509-1516.
9. Pepys M.B., Baltz, M.L, Tennent, G.A., Serum amyloid A (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response, *Eq. Vet. J.*, 1989, 21, 106-109.
10. Hulten, C., Grönlund, U., Hirvonen, J, et al., Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and α_2 -globulins during induced non-infectious arthritis in the horse, *Eq. Vet. J.*, 2002, 34, 699-704.
11. Jacobsen, S., Halling-Thonsen, M., Nanni, S., Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease, *Am. J. Vet. Res.*, 2006, 67, 1738-1742.
12. Jacobsen, S., Niewold, T.A., Halling-Thiomsen, M., et al., Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide induced arthritis, *Vet. Immunol Immunopathol* 2005, 110, 325-330.
13. McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R., et al., Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary associated serum amyloid A3 (M-SAA3) into colostrum, *Vet Immunol. Immunopathol.*, 2001, 83, 203-211.
14. Ma, Z., Mizukoshi, T., Khatlani, T.S., Okuda, M., and Onishi, T., Molecular cloning and sequencing of equine cDNA encoding serum amyloid A (SAA), *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2000, 77, 321-327.
15. Hultén, C., Sletten, K., Foyn Bruun, C., Marhaug, G., The acute phase serum amyloid A protein (SAA) in the horse: isolation and characterization of three isoforms, *Vet. Immunol., Immunopathol.*, 1997, 57, 215-227.
16. Wang, L., Lashuel, H.A., Walz, T., and Colón, W., Murine apolipoprotein serum amyloid A in solution forms a hexamer containing a central channel, *Proceed. Nat.Acad.Sci*, 2002, 99, 1597-19592.
17. Wang, L and Colón, W., The interaction between apolipoprotein serum amyloid A and high-density lipoprotein, *Biochem.Biophys. Res. Com.*, 2004, 317, 157-61.