



FUNKČNÍ VZOREK

Metoda detekce protilátek proti viru klíšťové encefalitidy v séru malých přežvýkavců

**RNDr. Jiří Salát, Ph.D.
Mgr. Petra Formanová
RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.
Doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.**

**5473
2017**

Funkční vzorek 5473/2017

Metoda detekce protilátek proti viru klíšťové encefalitidy v séru malých přežvýkavců

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.
Mgr. Petra Formanová
RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.
Doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

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

2017

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu QJ1510104 Národní agentury zemědělského výzkumu
Ministerstva zemědělství České republiky

ISBN 978-80-88233-27-5

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	4
3. Vlastní popis funkčního vzorku	4
3.1. <i>Metodika funkčního vzorku</i>	4
3.2. <i>Validace funkčního vzorku</i>	5
3.2.1. <i>Homogenita potažené destičky antigenem</i>	5
3.2.2. <i>Opakovatelnost – intra-assay</i>	6
3.2.3. <i>Opakovatelnost – inter-assay</i>	8
4. Srovnání novosti postupu	9
5. Uplatnění funkčního vzorku	9
6. Ekonomické aspekty	9
7. Seznam použité související literatury	10
8. Dedikace	10

1. Úvod

Klíšťová encefalitida (KE) je z hlediska Evropy jedním z nejzávažnějších infekčních onemocnění lidí postihující centrální nervový systém (CNS). V ČR je každoročně zaznamenáváno přibližně 600 případů.

Původce onemocnění, virus KE (VKE), je řazen mezi arboviry, tedy mezi viry, které jsou přenášeny krevsajícími členovci (Palus a Růžek, 2013). Taxonomicky je virus řazen do čeledi *Flaviviridae*, genom viru tvoří jednovláknová RNA kódující tři strukturní proteiny (C, M, E) a sedm nestrukturních proteinů. Nukleokapsida viru je tvořena virovou nukleovou kyselinou a kapsidovým proteinem C. Toto virové jádro je obaleno lipidovou membránou obsahující proteiny M a E. Hlavním povrchovým antigenem je právě protein E, který umožňuje vazbu na povrchové receptory hostitelské buňky a zprostředkovává tak její infekci (Heinz, 1986).

K přenosu viru na člověka dochází nejčastěji během infestace (přichycení a sání krve) infikovaným klíštětem, méně častým způsobem přenosu je alimentární cesta po pozření mléka kontaminovaného VKE. Hlavním přenašečem klíšťové encefalitidy v rámci České republiky je klíště obecné (*Ixodes ricinus*), výskyt KE je proto úzce svázán s rozšířením tohoto parazita a obdobím jeho aktivity během roku. Nejzávažnější forma onemocnění KE se projevuje jako encefalomyelitida (zánět mozku a míchy), která bývá spojena s nejtěžšími nebo i fatálními případy infekce (Gritsun a kol., 2003). V evropských zemích umírá na KE přibližně 1,5 % pacientů. Se zvyšujícím se věkem nemocného roste pravděpodobnost vzniku závažnějšího onemocnění a následně narůstá i četnost trvalých následků po prodělaném onemocnění a počet smrtelných případů (Lindquist a Vapalahti, 2008).

Vedle typických hostitelů VKE, zahrnujících obratlovce jako jsou hlodavci a hmyzožravci, kteří spolu s přenašečem sehrávají hlavní úlohu v udržení ohniska KE v daném prostředí, mohou být virem infikována také domestikovaná zvířata. U přežvýkavců má KE podobu asymptomatické infekce a nepředstavuje tak zdravotní problém pro samotného nakaženého hostitele. Riziko nákazy však ohrožuje člověka konzumujícího mléko nebo mléčné produkty. Alimentární cesta nákazy KE je druhým nejčastějším způsobem infekce člověka. Oproti náhodnému výskytu KE při infekcích přenesených klíšťaty mají alimentární infekce typický rodinný výskyt související s konzumací virem kontaminované potraviny. Zdrojem alimentární infekce člověka bylo identifikováno mléko koz, ovcí i krav infikovaných VKE (Grešíková, 1999). Přežvýkavci jsou obvykle infikováni VKE v období pastvy při sání nakaženého klíštěte. Experimentálně bylo potvrzeno, že u všech výše uvedených druhů přežvýkavců dochází po infekci KE k přechodné virémii trvající zpravidla několik dnů a následně je možné virus detekovat v mléce.

Virus si v mléce při 4°C zachovává infekčnost až po dobu dvou týdnů bez výrazného poklesu titru. Ve fyziologickém roztoku přitom přežívá za stejných podmínek po 14 dnech sledování pouze minimální množství virových částic. Na základě těchto zjištění bylo predikováno, že mléko má

protektivní vliv na stabilitu VKE a pokud je kontaminováno, zachovává si infekčnost pro spotřebitele po celou dobu jeho použitelnosti. Životaschopný virus se podařilo prokázat i ve všech testovaných mléčných produktech (kyselé mléko, máslo, smetana, tvaroh a syrovátka), přičemž nejvyšší perzistence viru byla zaznamenána v másle, kde během dvou měsíců sledování nedošlo k poklesu výchozího titru. VKE je možné v mléce účinně inaktivovat pasterizací při 72°C (Grešíková a kol., 1960)

Alimentární infekce KE byly zaznamenány ve většině oblastí výskytu tohoto onemocnění. Nejrozsáhlejší epidemie KE způsobená konzumací nepasterizovaného kozího mléka propukla v Rožňavě v bývalém Československu v roce 1951. Mlékem kontaminovaným VKE bylo nakaženo přes 660 lidí a 271 z nich muselo být hospitalizováno kvůli závažnému průběhu onemocnění (Blaškovič, 1954). V současné době se v České republice objevují spíše lokální epidemie alimentární KE malého rozsahu. V letech 1997-2008 bylo v České republice zaznamenáno 64 případů KE alimentárního původu, což odpovídalo 0,9 % všech případů diagnostikovaných KE v uvedeném období. Onemocnění se manifestovalo po požití tepelně neupraveného kozího mléka (56,3 %), ovčího sýra (32,8 %) nebo kravského mléka (10,9 %) (Kříž a kol., 2009). Popsán je také případ nákazy KE po požití jogurtu připraveného z nepasterizovaného mléka, ke kterému došlo v západních Čechách (Pazdiora a kol., 1994). První zdokumentovaná epidemie KE pocházející z ovčího sýru byla zaznamenána na Slovensku (Grešíková a kol., 1975), další opakované výskyty alimentárního typu infekce jsou v této zemi obvykle spojované s konzumací nepasterizovaného mléka ovcí a koz (Labuda a kol., 2002).

Po prodělané infekci KE je možné v séru malých přežvýkavců detekovat specifické protilátky proti VKE. Vyšetřením přítomnosti těchto specifických protilátek je možné identifikovat zvířata, která byla infikována VKE a vyhodnotit tak míru rizika alimentární infekce pro člověka v testovaném chovu.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem metodiky funkčního vzorku bylo zavést a validovat ELISA test, který bude umožňovat detekci specifických protilátek proti VKE u malých přežvýkavců po prodělané infekci KE.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

3.1. Metodika funkčního vzorku

Antigen pro vakcínu proti klíšťové encefalitidě byl připraven jako celovirionový preparát. Pomnožený virus VKE kmen Hypr byl purifikován z pomoci srážení, ultracentrifugací na gradientu a purifikací přes filtrační systémy. Množství proteinu v antigenním preparátu bylo měřeno metodou dle Bradfordové. Pro účely testu byl virus inaktivován a naředěn tak, aby jeho koncentrace byla 1 µg/ml ve vazebném karbonátovém pufru o pH 9,6. Antigen byl aplikován v objemu 100 µl do jamek

mikrotitrační destičky (Maxisorb, NUNC, USA). Vazba na dno jamky probíhala po dobu 16 hodin při 4°C. Jamky mikrotitrační destičky byly následně třikrát promyty PBS s 0,05 % Tween 20 s využitím poloautomatické promývačky ELx50 (Biotek Instrumentals, USA). Obsazení volných vazebných míst bylo provedeno přidáním 200 µl ředícího roztoku (PBS s 0,05% Tween 20 a 10 % fetálního bovinního séra) do jamek destičky (inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě). Následovalo trojnásobné promytí. Vyšetřovaná séra byla naředěna 1 : 200 v ředícím roztoku a aplikována do jamek. Inkubace sér v jamkách mikrotitrační destičky probíhala při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Následovalo trojnásobné promytí jamek destičky. Poté byl do jamek přidán protein G značený křenovou peroxidázou (Thermo Fisher Scientific) ředěný 1 : 10 000 (100 µl na jamku) v ředícím roztoku. Následovala inkubace (1 hodinu) při pokojové teplotě a další čtyřnásobné promytí. V dalším kroku byl aplikován substrátový roztok (TMB v citrátovém pufru) v objemu 100 µl do každé jamky. Reakce se nechala vyvíjet 20 minut, poté byla zastavena přidáním 2M kyseliny sírové v objemu 50 µl do každé jamky. Intenzita absorbance žlutě zbarveného reakčního produktu v jednotlivých jamkách byla měřena při 450 nm s využitím multifunkčního spektrofotometru (Synergy H1, Biotek Instrumentals, USA).

3.2. Validace funkčního vzorku

3.2.1. Homogenita potažené destičky

Testování homogenity potažení destičky antigenem se provádělo v dané šarži na jedné mikrotitrační destičce v 96 jamkách, do nichž bylo přidáno sérum obsahující protilátky proti VKE (sérum ředěno 1 : 200). Provedl se standardní test podle pracovního postupu uvedeného výše (výsledky viz tabulka 1) a byly vypočteny údaje průměrné hodnoty absorbance, směrodatné odchylky výběru a koeficientu variance.

Tabulka 1 (změřené hodnoty absorbancí při 450 nm):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,776	0,818	0,782	0,779	0,784	0,779	0,779	0,786	0,795	0,805	0,812	0,791
B	0,799	0,796	0,784	0,812	0,778	0,775	0,784	0,783	0,785	0,789	0,777	0,813
C	0,774	0,775	0,813	0,811	0,786	0,783	0,799	0,813	0,818	0,776	0,778	0,782
D	0,801	0,81	0,818	0,799	0,795	0,785	0,814	0,779	0,784	0,795	0,786	0,779
E	0,803	0,777	0,776	0,814	0,805	0,786	0,813	0,818	0,776	0,778	0,796	0,784
F	0,779	0,795	0,778	0,777	0,812	0,782	0,799	0,814	0,777	0,789	0,798	0,779
G	0,784	0,799	0,796	0,789	0,808	0,782	0,805	0,812	0,797	0,801	0,803	0,803
H	0,795	0,803	0,804	0,798	0,811	0,812	0,796	0,775	0,81	0,777	0,785	0,786

Výpočty:

Vzorec č. 1 - **Průměrná hodnota absorbance**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

(x ... hodnota absorbance vzorku, n ... počet vzorků)

Vzorec č. 2 - **Směrodatná odchylka výběru**

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

(x ... hodnota absorbance vzorku, $\bar{x}$... průměrná hodnota absorbance, n ... počet vzorků)

Vzorec č. 3 - **Koeficient variance**

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

(SD ... směrodatná odchylka výběru, $\bar{x}$... průměrná hodnota absorbance)

Vypočtené hodnoty:

Průměrná hodnota absorbance: 0,7932

Směrodatná odchylka výběru: 0,0137

Koeficient variance: 1,7236 %

3.2.2. Opakovatelnost – intra-assay

Prováděla se v jedné řadě na jedné mikrotitrační destičce se čtyřmi vzorky v zastoupení dvou vzorků séra s vysokým titrem protilátek proti VKE poskytující vysoké hodnoty absorbance (A více než 0,5) (KP – koza pozitivní, OP – ovce pozitivní) a dvou vzorků séra s nízkým titrem protilátek poskytující nízké hodnoty absorbance (A méně než 0,15) (KN – koza negativní, ON – ovce negativní) v 16 jamkách od každého vzorku. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše. Výsledky viz tabulka 2. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběru a koeficient variance (vzorce 1 – 3). Pro celý rozsah byla následně vypočtena směrodatná odchylka a variační koeficient, které vyjadřují přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah (vzorce 4 a 5).

Tabulka 2 (změřené hodnoty absorbancí při 450 nm):

	KP	KP	KN	KN	OP	OP	ON	ON
A	0,61	0,621	0,073	0,066	0,776	0,814	0,128	0,138
B	0,542	0,553	0,067	0,062	0,784	0,791	0,141	0,138
C	0,596	0,547	0,055	0,059	0,771	0,781	0,129	0,133
D	0,586	0,555	0,063	0,063	0,798	0,818	0,135	0,14
E	0,596	0,61	0,07	0,058	0,785	0,796	0,129	0,137
F	0,602	0,587	0,065	0,072	0,779	0,775	0,139	0,135
G	0,567	0,567	0,069	0,056	0,799	0,774	0,128	0,139
H	0,589	0,583	0,058	0,073	0,8	0,812	0,14	0,129

Vypočtené hodnoty pro jednotlivé vzorky:

Vzorek KP

Průměrná hodnota absorbance: 0,5819

Směrodatná odchylka výběru: 0,0242

Koeficient variance: 4,1662 %

Vzorek KN

Průměrná hodnota absorbance: 0,0643

Směrodatná odchylka výběru: 0,0060

Koeficient variance: 9,3935 %

Vzorek OP

Průměrná hodnota absorbance: 0,7908

Směrodatná odchylka výběru: 0,0151

Koeficient variance: 1,9084 %

Vzorek ON

Průměrná hodnota absorbance: 0,1349

Směrodatná odchylka výběru: 0,0048

Koeficient variance: 3,5802 %

Vzorec č. 4 - Přesnost pro celý rozsah

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 \dots (n_k - 1)s_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

(s ... směrodatná odchylka výběru vzorku, n ... počet vzorků)

Vzorec č. 5 - Relativní přesnost pro celý rozsah

$$CV = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)v_1^2 + (n_2 - 1)v_2^2 \dots (n_k - 1)v_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

(v ... koeficient variance vzorku, n ... počet vzorků)

Vypočtené hodnoty pro celý rozsah:

Přesnost pro celý rozsah: 0,0092

Relativní přesnost pro celý rozsah: 5,5234 %

3.2.3. Opakovatelnost – inter-assay

Prováděla se v jedné šarži jako deset samostatných analýz. Testovaly se čtyři vzorky v zastoupení dvou vzorků séra s vysokým titrem protilátek poskytující vysoké hodnoty absorbance (A více než 0,5) (KP – koza pozitivní, OP – ovce pozitivní) a dvou vzorků séra s nízkým titrem protilátek poskytující nízké hodnoty absorbance (A méně než 0,15) (KN – koza negativní, ON – ovce negativní), každý vzorek ve čtyřech jamkách. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše. Výsledky viz tabulka 3. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběru a koeficient variance a pro celý rozsah souboru přesnost a relativní přesnost (vzorce 1 – 5).

Tabulka 3 (změřené hodnoty absorbancí při 450 nm):

test č.	KP	KP	KN	KN	OP	OP	ON	ON
1	0,542	0,597	0,057	0,059	0,776	0,814	0,128	0,135
1	0,549	0,599	0,063	0,06	0,779	0,803	0,129	0,133
2	0,632	0,653	0,075	0,08	0,835	0,855	0,153	0,149
2	0,611	0,671	0,071	0,078	0,837	0,845	0,155	0,148
3	0,567	0,565	0,063	0,078	0,801	0,812	0,144	0,139
3	0,572	0,632	0,069	0,075	0,799	0,755	0,144	0,131
4	0,512	0,518	0,061	0,051	0,731	0,711	0,111	0,125
4	0,503	0,532	0,055	0,052	0,72	0,705	0,132	0,123
5	0,635	0,642	0,075	0,062	0,835	0,766	0,151	0,16
5	0,637	0,628	0,078	0,075	0,821	0,815	0,157	0,159
6	0,543	0,592	0,058	0,053	0,777	0,812	0,129	0,132
6	0,548	0,578	0,061	0,059	0,798	0,814	0,134	0,14
7	0,649	0,622	0,075	0,079	0,822	0,846	0,155	0,162
7	0,652	0,645	0,082	0,065	0,832	0,812	0,149	0,163
8	0,522	0,532	0,055	0,052	0,774	0,781	0,123	0,142
8	0,512	0,547	0,054	0,051	0,768	0,755	0,125	0,12
9	0,635	0,647	0,077	0,069	0,832	0,803	0,146	0,132
9	0,599	0,632	0,076	0,071	0,834	0,812	0,137	0,148
10	0,541	0,557	0,051	0,059	0,781	0,766	0,125	0,128
10	0,555	0,571	0,052	0,063	0,795	0,78	0,129	0,121

Vypočtené hodnoty pro jednotlivé vzorky:

Vzorek KP

Průměrná hodnota absorbance: 0,5869

Směrodatná odchylka výběru: 0,0491

Koeficient variance: 8,3607 %

Vzorek KN

Průměrná hodnota absorpance: 0,065

Směrodatná odchylka výběru: 0,01

Koeficient variance: 15,479 %

Vzorek OP

Průměrná hodnota absorpance: 0,7952

Směrodatná odchylka výběru: 0,0373

Koeficient variance: 4,6914 %

Vzorek ON

Průměrná hodnota absorpance: 0,1387

Směrodatná odchylka výběru: 0,01339

Koeficient variance: 9,6565 %

Vypočtené hodnoty pro celý rozsah:

Přesnost pro celý rozsah: 0,0369

Relativní přesnost pro celý rozsah: 11,9465 %

4. Srovnání novosti postupů

Rutinní detekce specifických protilátek proti VKE u malých přežvýkavců pro vyhodnocení rizika alimentární infekce KE z daného chovu není podle našich informací v současné době používána.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je na pracovištích autorů zaveden a je využíván k výzkumným účelům. Potenciální komerční využití testu závisí na zájmu chovatelů malých přežvýkavců o vyhodnocení míry rizika alimentární infekce KE z daného chovu.

6. Ekonomické aspekty

V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout. Cena jednotlivých vyšetření a míra potenciálního komerčního zisku bude závislá na množství vyšetřovaných vzorků.

7. Seznam použité literatury

- Blaškovič, D., Epidémia encefalitídy v Rožňavskom prírodnom ohnisku nákaz. SAV, Bratislava. 1954.
- Grešíková, M., Havárnek, I., Gorner, F. Vplyv pasterizácie na infektivitu vírusu kliestovej encefalitídy. Vet Cas 1960;9:462-469.
- Grešíková, M., Sekeyova, M., Stupalova, S., Necas, S. Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. Intervirology 1975;5:57-61.
- Grešíková, M. Kliešťová encefalitída – trvalý verejno-zdravotnícky problém. Veda, SAV, Bratislava. 1999.
- Gritsun, T.S., Lashkevich, V.A., Gould, E.A. Tick-borne encephalitis. Antiviral Res 2003;57:129-146.
- Heinz, F.X. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. Adv Virus Res 1986;31:103-168.
- Kříž, B., Beneš, Č., Daniel, M. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). Epidemiol Mikrobiol Imunol 2009;58:98-103.
- Labuda, M., Elecková, E., Licková, M., Sabó, A. Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. Int J Med Microbiol 2002;291, Suppl 33:43-7.
- Lindquist, L., Vapalahti, O. Tick-borne encephalitis. Lancet 2008;371:1861-1871.
- Palus, M., Růžek, D. Klíšťová encefalitida – stále více otazníků než jasných odpovědí. Vakcinologie 2013;7: 158-164.
- Pazdiora, P., Morávková, I., Bruj, J. Alimentární přenos u rodinného výskytu klíšťové encefalitidy. Prak Léč 1994;74:209-210.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu QJ1510104 Národní agentury zemědělského výzkumu Ministerstva zemědělství České republiky.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz