



FUNKČNÍ VZOREK

ELISA test k detekci hladiny protilátek proti viru hepatitidy E u prasat

**Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Hana Kudláčková
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.**

**5645
2018**

VUVeL



VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO
LÉKARSTVÍ, v. v. i.

Výzkumný ústav
veterinárního lékařství, v. v. i.,
Veterinary Research Institute
Hudcova 296/70
621 00 Brno

vri@vri.cz

Sekretariát:
+420 5 3333 2501
Operátor:
+420 5 3333 1111

www.vri.cz

Funkční vzorek

5645/2018

ELISA test k detekci hladiny protilátek proti viru hepatitidy E u prasat

Autoři

Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.

MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.

Hana Kudláčková

Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.

Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038

2018

ISBN 978-80-88233-53-4

OBSAH

Úvod

I. Cíl

II. Vlastní popis metodiky

- II.1.** Rekombinantní protein ORF2 HEV3
- II.2.** Metodika ELISA reakce
- II.3.** Vyhodnocení ELISA testu
- II.4.** Validace ELISA reakce

III. Srovnání „novosti postupů“

IV. Popis uplatnění funkčního vzorku

V. Ekonomické aspekty

VI. Seznam použité související literatury

Dedikace

Úvod

Virus hepatitidy E (HEV) je řazen mezi nejčastější původce perorálně přenosných hepatitid. Jedná se o neobalený virus o velikosti 27 - 34 nm. V současné době je zařazen do čeledi Hepeviridae a většina savčích izolátů do rodu Hepevirus (Carstens, 2010; Kamar et al., 2012). Genom HEV je tvořen jedním řetězcem ribonukleové kyseliny (RNA) s pozitivní polaritou. Skládá se ze tří otevřených čtecích rámců (ORF). ORF1 kóduje nestrukturální proteiny, tzn. enzymy potřebné pro replikaci virového genomu, jako jsou RNA polymeráza a helikáza. ORF2 kóduje jediný glykoproteid virové kapsidy, který zahrnuje imunogenní epitopy. ORF3 kóduje fosforylovaný protein (fosfoprotein), který je asociován s cytoskeletem infikované buňky a podílí se na replikaci virových částic (Yamada et al., 2009). Na základě analýzy genomů dostupných izolátů a v souvislosti se schopností infikovat člověka lze v rámci rodu Hepevirus rozpoznat zatím čtyři hlavní genotypy (HEV1, HEV2, HEV3 a HEV4; Lu et al., 2006). Tyto genotypy mohou mít různé způsoby šíření, rezervoáry, možnosti mezidruhového přenosu a s tím spojenou etiopatogenezi onemocnění (Kamar et al., 2012).

Virus hepatitidy E (HEV) je původcem onemocnění člověka, virové hepatitidy typu E, které je v Evropě za posledních 10 let spojováno s 21 000 hlášenými akutními případy hepatitidy a 28 úmrtími. V tomto období byl pozorován téměř desetinásobný nárůst hlášených případů tohoto onemocnění. V celé řadě evropských zemích virová hepatitida E nepodléhá povinnosti hlášení, proto celkové množství případů této hepatitidy je Evropě podhodnocen. Infekce člověka má většinou mírný průběh, ale zejména u pacientů s preexistujícím onemocněním jater může mít až fatální následky, u imunosuprimovaných pacientů je popisován přechod do chronicity (Aggarwal and Jameel, 2011). Pro humánní použití byla vyvinuta vakcína proti HEV1, která je používána v Číně a chrání člověka před infekcí a projevy onemocnění. Jedná se o inaktivovanou vakcínu založenou na rekombinantní *E. coli* exprimující část obalového proteinu viru (ORF2) (Li et al., 2005).

V evropských zemích je nejčastěji zaznamenán výskyt genotypu 3 (HEV-3), u něhož byl prokázán zoonotický potenciál. HEV-3 byl zjištěn v chovech prasat domácích i u prasat divokých téměř po celém světě. Za hlavní cestu šíření tohoto genotypu byl stanoven přenos kontaminovanými potravinami živočišného původu, přičemž prasata domácí i divoká jsou považována za hlavní zvířecí rezervoár HEV-3 (van der Poel, 2014).

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky bylo zavést a validovat ELISA metodu ke stanovení hladiny protilátek proti viru HEV3 u prasat.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. Rekombinantní protein ORF2 HEV3

V ELISA testu jsou stanovovány hladiny protilátek proti kapsidovému proteinu ORF2 HEV3, který byl využit jako antigen. Rekombinantní protein ORF2 HEV3 AA386-661 představuje část strukturálního proteinu ORF2 HEV3 v rozsahu aminokyselin 368-661 nativního proteinu. Pro konstrukci plasmidu umožňujícího expresi fragmentu ORF2 HEV3 byl použit kmen *Escherichia coli* K12/TOP10 (Thermo Fischer Scientific). Finální plasmid byl následně transfekován do *Escherichia coli* BL21 (Sigma-Aldrich), která po indukci exprese produkuje fragment ORF2 proteinu HEV3. Tento protein obsahuje na svém N-konci polyhistidinovou kotvu umožňující jeho purifikaci. Takto izolovaný protein byl pro potřeby ELISA testu dále přečištěn preparativní elektroforézou (model 491 prep cell Bio-Rad) na čistou frakci proteinu (obr.1).

Obrázek 1 – SDS-PAGE purifikovaného rekombinantního proteinu ORF2 HEV3_AA386-661 použitého v ELISA testu. Silný proužek v pravém sloupci je rekombinantní protein ORF2 HEV3_AA386-661 o přibližné molekulové hmotnosti 40 kDa.



II.2. Metodika ELISA reakce

ELISA test byl připraven potažením jamek mikrotitrační desky rekombinantním proteinem ORF2 HEV3 v pracovním ředění 1 µg/ml v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 µl na jamku (inkubace 16 hodin, 4°C). Následně byly desky třikrát promyty PBS s obsahem 0,05 % Tween 20 (PBS-T, pH 7,2). Poté byla mikrotitrační destička 30 minut blokována při pokojové teplotě roztokem PBS s přídavkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a 10% sacharózy v objemu 200 µl na jamku. Vyšetřované vzorky prasečího séra byly ředěny 100x v PBS-T s přídavkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 µl byly aplikovány do jamek mikrotitrační desky. Po inkubaci (1 h, 37 °C, vlhká komůrka) byly desky třikrát promyty roztokem PBS-T a do jamek bylo přidáno 100 µl anti-prasečí polyklonální protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) v příslušném pracovním ředění. Po inkubaci (60 min, 37 °C, vlhká komůrka) byly desky opět třikrát promyty a do jamek bylo přidáno 100 µl roztoku substrátu s chromogenem TMB Complete (Test-line, Brno, Česká republika). Enzymatická reakce byla zastavena po 10 minutách přídavkem 50 µl 2M kyseliny sírové. Výsledná absorbance byla odečtena pomocí multikanálového spektrofotometru Synergy H1 (Biotek, USA) při vlnové délce 450 nm.

Pro validaci testu byla použita séra prasat z vakcinačního experimentu, kde skupina deseti odstavených selat byla vakcinována inaktivovanou vakcínou obsahující rekombinantní antigen ORF2 HEV3 AA386-661. Druhá skupina deseti odstavených selat vakcinována nebyla a séra těchto selat byla použita jako séra negativní na přítomnost protilátek proti HEV3.

II.3. Vyhodnocení ELISA testu

Hladina protilátek proti viru HEV3 stanovená pomocí ELISA soupravy připravené z purifikovaného rekombinantního antigenu ORF2 HEV3 dosahovala u negativních vzorků průměrné hodnoty absorbance 0.217; SD 0.091. Hranice positivity byla stanovena jako hodnota průměrné absorbance sérologicky negativních vzorků zvětšené o trojnásobek směrodatné odchylky, t.j. $0.217 + 3 \times 0.091 =$ hodnota absorbance 0.49.

II.4. Validace ELISA reakce s antigenem ORF2HEV3

a) Homogenita potažení mikrotitrační desky antigenem ORF2HEV3:

Test byl proveden na jedné 96 jamkové desce dané výrobní šarže s jedním vzorkem séra. Byl proveden standardní ELISA test dle pracovního postupu uvedeného výše. Výsledek testu je vyjádřen pomocí průměrné hodnoty absorbancí vyšetřovaného vzorku séra a variačního koeficientu (CV). Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Výsledky testu homogenity potažení mikrotitrační desky antigenem ORF2HEV3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.304	1.27	1.233	1.266	1.251	1.233	1.292	1.238	1.253	1.285	1.269	1.223
B	1.279	1.236	1.211	1.193	1.219	1.221	1.21	1.208	1.222	1.24	1.24	1.263
C	1.243	1.251	1.229	1.197	1.201	1.207	1.178	1.158	1.196	1.215	1.251	1.274
D	1.198	1.216	1.184	1.163	1.173	1.14	1.178	1.196	1.225	1.17	1.223	1.247
E	1.16	1.174	1.166	1.151	1.144	1.146	1.14	1.151	1.16	1.148	1.228	1.184
F	1.165	1.135	1.156	1.153	1.142	1.125	1.14	1.147	1.16	1.163	1.19	1.113
G	1.189	1.138	1.103	1.127	1.142	1.111	1.141	1.134	1.15	1.162	1.189	1.108
H	1.19	1.126	1.118	1.163	1.187	1.174	1.213	1.202	1.174	1.224	1.28	1.264

průměrná hodnota absorbance: 1.193

směrodatná odchylka výběrová: 0.049

variační koeficient (%): 4.072

b) Opakovatelnost (intra-assay variability) pro antigen ORF2HEV3:

Tento test byl proveden v jedné výrobní šarži mikrotitračních desek se čtyřmi vzorky, v zastoupení 1 vzorek negativní (N) a tři pozitivní (P1, P2 a P3) vzorky séra v šestnácti replikacích od každého vzorku dle standardního pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočítána průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběrová a variační koeficient (Tabulka 2). Výsledkem testu je variační koeficient pro celý rozsah měření.

Tabulka 2: Výsledky testu opakovatelnosti (intra-assay variability) pro antigen ORF2HEV3:

číslo měření	N	P1	P2	P3
1	0.217	1.14	1.321	1.392
2	0.221	1.152	1.347	1.555
3	0.239	1.155	1.325	1.514
4	0.249	1.125	1.318	1.574
5	0.234	1.139	1.349	1.55
6	0.225	1.17	1.368	1.577
7	0.238	1.158	1.363	1.559
8	0.217	1.149	1.416	1.576
9	0.205	1.182	1.249	1.446
10	0.234	1.17	1.333	1.599
11	0.23	1.144	1.311	1.566
12	0.237	1.203	1.338	1.652
13	0.239	1.104	1.33	1.601
14	0.237	1.196	1.4	1.625
15	0.274	1.128	1.37	1.585
16	0.232	1.019	1.418	1.627

Závěrečná tabulka:

Intra-assay	N	P1	P2	P3
Počet testů	16	16	16	16
Průměr absorbancí	0.233	1.146	1.347	1.562
Směrodatná odchylka	0.015	0.043	0.043	0.066
Variační koeficient [%]	6.632	3.717	3.167	4.218
Směrodatná odchylka pro celý rozsah	0.045			
Variační koeficient pro celý rozsah [%]	4.627			

c) Opakovatelnost (inter-assay variability) pro antigen ORF2HEV3:

Zkouška byla provedena na deskách pocházejících z jedné výrobní šarže. Testování bylo provedeno jako deset samostatných analýz. Byly testovány čtyři vzorky, v zastoupení 1 vzorek negativní (N) a tři pozitivní (P1, P2 a P3) vzorky séra, každý vzorek v kvadruplikátu dle standardního pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočítána průměrná hodnota absorbance ze všech testů, dále směrodatná odchylka výběrová a variační koeficient pro celý rozsah měření (Tabulka 3).

Tabulka 3: Výsledky testu opakovatelnosti (inter-assay variability) pro antigen ORF2HEV3

číslo testu	číslo vzorku	absorbance			
1	N	0.177	0.178	0.183	0.191
	P1	0.541	0.575	0.562	0.555
	P2	0.876	0.89	0.868	0.936
	P3	0.981	0.996	0.979	1.021
2	N	0.161	0.174	0.18	0.181
	P1	0.524	0.569	0.554	0.581
	P2	0.823	0.833	0.792	0.887
	P3	0.933	0.96	0.95	1.01
3	N	0.157	0.183	0.176	0.174
	P1	0.52	0.553	0.527	0.596
	P2	0.824	0.825	0.852	0.891
	P3	0.876	0.916	0.925	1.002
4	N	0.143	0.165	0.162	0.167
	P1	0.529	0.566	0.589	0.584
	P2	0.835	0.822	0.83	0.878
	P3	0.932	0.921	0.965	1.007
5	N	0.189	0.16	0.167	0.169
	P1	0.619	0.674	0.637	0.626
	P2	0.913	0.925	0.926	0.904
	P3	1.034	1.009	1.102	1.054
6	N	0.167	0.155	0.169	0.166
	P1	0.637	0.604	0.618	0.608
	P2	0.895	0.876	0.943	0.96
	P3	0.946	0.979	1.01	1.045
7	N	0.15	0.137	0.164	0.155
	P1	0.63	0.608	0.603	0.641
	P2	0.831	0.838	0.905	0.901
	P3	1.007	0.997	0.994	1.026
8	N	0.147	0.151	0.147	0.148
	P1	0.606	0.597	0.592	0.602
	P2	0.814	0.848	0.867	0.892
	P3	0.973	1.015	1.018	1.075
9	N	0.15	0.148	0.155	0.153
	P1	0.636	0.599	0.596	0.594
	P2	0.852	0.837	0.892	0.901
	P3	0.978	0.998	1.037	1.078
10	N	0.148	0.154	0.153	0.15
	P1	0.674	0.655	0.625	0.583
	P2	0.888	0.876	0.922	0.943
	P3	1.047	1.039	1.059	1.077

Závěrečná tabulka:

Inter-assay	N	P1	P2	P3
Počet testů	40	40	40	40
Průměr absorbancí	0.163	0.595	0.875	0.999
Směrodatná odchylka	0.014	0.039	0.041	0.05
Variační koeficient [%]	8.397	6.562	4.738	5.04
Směrodatná odchylka pro celý rozsah	0.039			
Variační koeficient pro celý rozsah [%]	6.352			

III. Srovnání „novosti postupů“

Na trhu je komerčně dostupný podobný test ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species ELISA.

IV. Uplatnění funkčního vzoru

ELISA test k detekci hladiny protilátek proti viru hepatitidy E u prasat je používán v laboratoři autorů k výzkumným účelům.

Potenciál dalšího využití metody je v komerčním stanovení hladin protilátek proti viru hepatitidy E u prasat.

V. Ekonomické aspekty

Metoda je na pracovišti autorů zavedena a používána. Komerční využití závisí na zájmu chovatelů nebo státních orgánů detekovat protilátky proti viru hepatitidy E u prasat.

VI. Seznam použité a související literatury

Aggarwal, R., Jameel, S. Hepatitis E. Hepatology. 2011;54:2218-2226.

Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). Arch Virol. 2010;155:133-46.

Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H.R. Hepatitis E. Lancet. 2012;379:2477-2488.

Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev Med Virol. 2006;16:5-36.

Van der Poel, W.H. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. Curr Opin Virol. 2014;4:91-96.

Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., Tanaka, T., Okamoto, H. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. J Gen Virol. 2009;90:1880-1891.

Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70, 621 00 Brno

Název: ELISA test k detekci hladiny protilátek proti viru hepatitidy E u prasat

Autoři: Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Hana Kudláčková
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.



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