



FUNKČNÍ VZOREK

**Nepřímý ELISA test pro stanovení
specifických protilátek proti lidskému
choriovému gonadotropinu v séru koček**

**Hana Kudláčková
MVDr. et Mgr. Kateřina Horáčková
MVDr. Zora Smržová
MVDr. Eliška Hrabálková
MVDr. Alena Bartošková, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

**3081
2016**

**Funkční vzorek
3081/2016**

**Nepřímý ELISA test pro stanovení specifických protilátek proti
lidskému choriovému gonadotropinu v séru koček**

**Hana Kudláčková
Kateřina Horáčková
Zora Smržová
Eliška Hrabálková
Alena Bartošková
Martin Faldyna**

2016

ISBN 978-80-86895-93-2

Funkční vzorek

Nepřímý ELISA test pro stanovení specifických protilátek proti lidskému choriovému gonadotropinu v séru koček

Hana Kudláčková¹
MVDr. et Mgr. Kateřina Horáčková^{1,2}
MVDr. Zora Smržová¹
MVDr. Eliška Hrabálková^{1,2}
MVDr. Alena Bartošková, Ph.D.²
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.¹

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

² Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu LO1218 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU-I.

2016

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky	4
3. Vlastní popis metodiky	4
3.1. Sestavení ELISA metody	4
3.2. Validace ELISA metody	5
3.3.1. Homogenita potažené destičky	5
3.3.2. Opakovatelnost - intra assay	7
3.3.3. Opakovatelnost - inter assay	8
4. Srovnávání „novosti postupů“	9
5. Popis uplatnění certifikované metodiky	9
6. Ekonomické aspekty	9
7. Seznam použité související literatury	9
8. Dedikace	10

1. Úvod

Rozvoj a poznatky z veterinární medicíny, především oboru reprodukce, hrají klíčovou roli v programech na záchranu ohrožených druhů zvířat včetně volně žijících kočkovitých šelem, které patří mezi jednu z nejohroženějších skupin zvířat na Zemi. Stále častěji se využívá metod asistované reprodukce pro zvýšení pravděpodobnosti zabřezávání samic a udržování březosti s cílem navýšit počty těchto zvířat a případně je navracet zpět do volné přírody (**Pelican a kol., 2006; Swanson, 2006**). Během těchto zásahů je využíváno velké množství léčivých přípravků, především hormonální povahy. Běžně užívaným hormonem při asistované reprodukci je equinní choriový gonadotropin vykazující podobné účinky jako folikulostimulující hormon (FSH). Tento se běžně kombinuje s humánním choriovým gonadotropinem (hCG), jehož fyziologické účinky jsou podobné účinkům luteotropního hormonu (LH). Tyto hormony se využívají při asistované reprodukci rovněž u kočkovitých šelem, v literatuře je však opakovaně popisováno, že po několika aplikacích se u koček požadovaná reakce na hCG snižuje (**Rodrigues da Paz a kol., 2006**).

Luteinizační hormon je glykoprotein hormonální povahy fyziologicky produkován v adenohypofýze a jeho uvolňování má pulzační charakter. U samic se váže na receptor buněk granulózy, čímž způsobí zvýšenou produkci progesteronu, následně ovulaci, luteinizaci a vznik *corpus luteum*. Působením na thekální buňky zvyšuje produkci androstenedionu a testosteronu. Androstenedion je potom buňkami granulózy konvertován na estradiol (**Trojan a kol., 2003**).

Glykoprotein **folikulostimulační hormon** je rovněž produkován v hypofýze, ze které je uvolňován periodicky. Jeho hlavní funkcí je stimulace růstu buněk *membrana granulosa* a přeměny buněk stromatu na buňky thekální. Spolu s estrogeny zmnožuje receptory pro LH a FSH, což má za následek další zvyšování hladiny estrogenů a růst folikulů. V luteální fázi je potom množství receptorů pro LH důležité pro dostatečnou tvorbu progesteronu (**Trojan a kol., 2003**).

Equinní choriový gonadotropin (eCG), neboli také koňský sérový gonadotropin (pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG), je glykoprotein produkován placentou březí klisny. Ze séra ho lze izolovat nejlépe mezi 40. a 130. dnem březosti. Jeho hlavní funkcí v organismu klisny je udržet efekt primárních a sekundárních žlutých tělísek. Vzhledem k tomu, že má velmi podobné účinky jako FSH (především stimulace folikulárního růstu), ale na rozdíl od něho v organismu přetrvává delší dobu, bývá využíván v asistované reprodukci v kombinaci s GnRH nebo hCG (**Adams a kol., 2001**).

Humánní choriový gonadotropin má podobné biologické účinky jako LH u samců i u samic a váže se na stejný receptor (**Casarini a kol., 2012; Viswanath a kol., 2007**). Je to glykoprotein, který je u ženy tvořen během těhotenství buňkami trofoblastu za účelem zvýšené sekrece progesteronu a estrogenů v *corpus luteum*, aby nedošlo k předčasnému ukončení gravidity. Jeho sekrece je nutná především do té doby, než dojde k plné sekreci výše uvedených hormonů placentou. Stejně jako LH působí již na samčí plody v děloze, čímž

umožní diferenciaci pohlavních orgánů. Ke konci těhotenství má rovněž vliv na kontraktilitu myometria. Již od 7. dne po oplodnění je vylučován ledvinami do moče, kde jsou jeho hladiny měřitelné od 14. dne gravidity. Od 60. dne gravidity jeho hladiny klesají. (Trojan a kol., 2003). Z moči těhotných žen se dá hormon izolovat a je potom dále využíván ve farmaceutickém průmyslu především za účelem podpory reprodukčních vlastností jedince. Jeho biologický efekt přetrvává delší dobu než efekt LH, proto je hojně v medicíně humánní i veterinární používán (Adams a kol., 2001).

Struktura hCG je velmi podobná LH, FSH a TSH (tyreotropní hormon). Všechny tyto čtyři hormony se skládají ze dvou podjednotek – α a β , přičemž α řetězec je u všech identický. Pouze řetězec β je tedy zodpovědný za rozdíly v morfologii i vlastnostech těchto glykoproteinů (Yu a kol., 2007). Hormon hCG je v současné době dostupný jak samostatně, v České republice jako hromadně vyráběný léčivý přípravek pro humánní využití pod názvem Pregnyl, tak v kombinaci se sérovým gonadotropinem březích klisen (eCG). V této kombinaci je dostupný v řadě hromadně vyráběných léčivých přípravků pro veterinární užití registrovaných k použití u prasat. Léčivé přípravky jsou vyráběny ve formě lyofilizátů určených k intramuskulární nebo subkutánní aplikaci (AISLP, 2013).

Imunitní systém zpravidla reaguje na cizorodé látky v těle s cílem je neutralizovat nebo zničit. Při přetrvávajícím nebo opakovaném stimulu se aktivují specifické imunitní mechanismy, kdy dochází k tvorbě protilátek nebo k buněčné odpovědi na konkrétní antigen. Vzhledem k tomu, že hCG je pro tělo kočky látkou cizorodou, lze předpokládat, že imunitní odpověď hraje ve snižování jeho účinnosti u kočkovitých šelem významnou roli (Swanson a kol., 1995; Swanson a kol., 1996).

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Opakovaná aplikace hormonálního preparátu může vést ke snížení jeho účinnosti. Jednou z příčin může být vzestup hormon-specifických protilátek, které mají schopnost neutralizovat biologický účinek tohoto hormonu. Proto cílem metodiky funkčního vzorku bylo sestavit a validovat ELISA test, který bude umožňovat detekci protilátek ve vzorcích sér koček.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

3.1. Sestavení ELISA metody

1. Vazba antigenu

Jako antigen byl použit hCG v HVLP Pregnyl 1 500 inj.pso.lgf 3x 1 500 UT (N.V.Organon, Nizozemsko) naředěný tak, aby jeho koncentrace byla 50 IU/ml ve vazném karbonátovém pufru o pH 9,6, tento byl aplikován o objemu 100 μ l do každé jamky mikrotitrační desky Maxisorp (Nunc, Dánsko) Vazba na dno jamky probíhala přes noc při chladničkové teplotě. Poté byly jamky 5x promyty směsí PBS a 0,05% Tweenu 20.

2. *Blokace nespecifických vazebných míst*

Do jamek bylo napipetováno 100 µl roztoku obsahujícího 0,5% kaseinového hydrolyzátu a 10% sacharózy. Poté se deska inkubovala při pokojové teplotě 60 minut, následně byl její obsah odstraněn vyklepnutím.

3. *Aplikace sér*

Vyšetřovaná séra, pozitivní a negativní kontroly byly naředěny 100x. Ředící roztok měl složení PBS, 0,05% Tween 20 a 0,5% kaseinový hydrolyzát. Vyšetřované vzorky a standardní pozitivní a negativní kontrolní séra byly testovány vždy v duplikátech. Inkubace probíhala 60 minut při pokojové teplotě. Jamky byly opět 5x promyty směsí PBS a 0,05% Tweenu 20.

4. *Aplikace konjugátu*

Do jamek byla přidána 100.000x ředěná sekundární protilátka konjugovaná křenovou peroxidázou anti-cat IgG H+L (Bethyl Laboratories, USA) v objemu 100 µl na jamku v ředícím roztoku (PBS, 0,5% Tween a 0,5% kaseinový hydrolyzát). Inkubace probíhala při pokojové teplotě 30 minut. Jamky byly opět 5x promyty promývacím roztokem.

5. *Aplikace substrátu*

Do jamek byl aplikován substrát s chromogenem TMB complete (Test-line, Česká republika) v objemu 100 µl do každé jamky, který se nechal působit po dobu 10 až 30 minut.

6. *Zastavení reakce*

Pro zastavení reakce byla přidána 2M H₂SO₄ v objemu 50 µl do každé jamky.

7. *Měření absorbance*

Absorbance byla měřena při 450 nm pomocí multikanálového spektrofotometru Synergy H1 (BioTek, USA). Pracovní ředění antigenu a konjugátu je ověřováno boxovou titrací se standardními vzorky sér vždy pro každou novou šarži antigenu nebo konjugátu.

Hranice positivity vyšetřovaných vzorků byla určena průměrem hodnot naměřených absorbancí kontrolních negativních sér a trojnásobkem směrodatné odchylky tohoto průměru.

3.2. Validace metody

3.2.1. *Homogenita potažené destičky*

Prováděla se v dané šarži na jedné mikrotitrační destičce v 96 jamkách s jedním sérem v ředění 100x. Provedl se standardní test podle pracovního postupu uvedeného výše a byly vypočteny hodnoty průměru absorbancí, směrodatné výběrové odchylky a variačního koeficientu.

Výpočet:

- průměrná hodnota absorbance – vzorec č. 1

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

kde x ... hodnota absorbance vzorku
 n ... počet vzorků

- směrodatná výběrová odchylka – vzorec č. 2

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

kde x ... hodnota absorbance vzorku
 $\bar{x}$... průměrná hodnota absorbance
 n ... počet vzorků

- variační koeficient – vzorec č. 3

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

kde SD ... směrodatná výběrová odchylka
 $\bar{x}$... průměrná hodnota absorbance

Tabulka č. 1. Výsledky měření absorbance. Pro výpočet byly vynechány hodnoty z jamek na okraji destičky a bylo tak počítáno pouze s hodnotami z 60 jamek.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,841	0,787	0,842	0,885	0,810	0,834	0,835	0,872	0,792	0,776	0,779	
B	0,824	0,831	0,829	0,786	0,795	0,811	0,797	0,779	0,758	0,708	0,714	0,756
C	0,700	0,731	0,727	0,719	0,705	0,764	0,726	0,729	0,724	0,728	0,732	0,732
D	0,721	0,756	0,766	0,737	0,761	0,731	0,748	0,712	0,688	0,806	0,816	0,812
E	0,792	0,756	0,777	0,764	0,761	0,739	0,696	0,702	0,668	0,723	0,712	0,716
F	0,756	0,722	0,670	0,708	0,699	0,699	0,697	0,677	0,688	0,672	0,688	0,685
G	0,772	0,767	0,751	0,785	0,720	0,799	0,784	0,803	0,792	0,780	0,803	0,817
H	0,922	0,899	0,887	0,973	0,894	0,867	0,848	0,855	0,790	0,858	0,884	0,883

Vypočtené hodnoty

průměrná hodnota absorbance 0,7436
směrodatná výběrová odchylka 0,043079
variační koeficient (%) 5,793361

3.2.2. Opakovatelnost – intra-assay

Prováděla se v jedné šarži na jedné mikrotitrační destičce minimálně se 4 vzorky v zastoupení 2 vzorky s nízkou absorbancí a 2 a vzorky s vysokou absorbancí v 16 jamkách od každého vzorku. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatné výběrové odchylky a variační koeficienty. Pro celý rozsah byla následně vypočtena směrodatná odchylka a variační koeficient, které vyjadřují přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah.

Výpočet: průměrné hodnoty absorbance, směrodatné výběrové odchylky a variační koeficienty viz vzorce č. 1, 2 a 3.

- přesnost pro celý rozsah – vzorec č. 4

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

kde s ... směrodatná výběrová odchylka vzorku

n ... počet vzorků

- relativní přesnost pro celý rozsah – vzorec č. 5

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

kde v ... variační koeficient vzorku

n ... počet vzorků

Tabulka č. 2. Výsledky měření absorbance.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,326	0,376	0,081	0,077	0,581	0,641	1,400	1,372
B	0,302	0,313	0,082	0,076	0,591	0,580	1,327	1,309
C	0,366	0,260	0,078	0,075	0,568	0,564	1,415	1,361
D	0,353	0,318	0,082	0,076	0,593	0,623	1,468	1,448
E	0,319	0,414	0,082	0,077	0,600	0,630	1,512	1,424
F	0,325	0,399	0,084	0,080	0,627	0,662	1,523	1,520
G	0,334	0,358	0,085	0,083	0,676	0,746	1,623	1,624
H	0,351	0,330	0,089	0,089	0,788	0,775	1,665	1,702

Vypočtené hodnoty

Přesnost pro celý rozsah 0,07

Relativní přesnost pro celý rozsah (%) 9,32

3.2.3. Opakovatelnost – inter-assay

Prováděla se v jedné šarži jako 10 samostatných analýz. Testovaly se 4 vzorky – 2 s nízkou a 2 s vysokou absorbancí, každý vzorek ve 4 jamkách, současně se analyzovaly slepé vzorky a kontrolní séra soupravy testované šarže. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorpance, směrodatná výběrová odchylka a variační koeficient a pro celý rozsah soupravy přesnost a relativní přesnost.

Výpočet: průměrná hodnota absorpance, směrodatná výběrová odchylka, variační koeficient, přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah – viz vzorce č. 1, 2, 3, 4 a 5.

Tabulka č. 3. Hodnoty absorpance dvou vzorků s nízkou absorbancí (A a B) a dvou vzorků s vysokou absorbancí (C a D).

A	B	C	D
0,094	0,361	0,704	1,645
0,090	0,284	0,738	1,690
0,093	0,373	0,806	1,817
0,095	0,325	0,909	1,922
0,090	0,353	0,684	1,582
0,097	0,340	0,701	1,760
0,090	0,328	0,735	1,713
0,089	0,304	0,817	1,818
0,100	0,330	0,614	1,573
0,086	0,271	0,664	1,599
0,086	0,244	0,687	1,731
0,086	0,293	0,748	1,819
0,083	0,237	0,592	1,444
0,087	0,283	0,665	1,474
0,085	0,254	0,697	1,627
0,085	0,258	0,746	1,718
0,081	0,218	0,611	1,523
0,079	0,197	0,664	1,579
0,084	0,230	0,682	1,581
0,087	0,222	0,708	1,812
0,093	0,197	0,594	1,577
0,082	0,227	0,618	1,675
0,081	0,223	0,692	1,664
0,084	0,248	0,710	1,879
0,092	0,328	0,708	1,592
0,099	0,263	0,847	1,694
0,110	0,231	0,920	1,779
0,088	0,278	0,944	1,874
0,085	0,294	0,857	1,737

0,082	0,301	0,873	1,790
0,083	0,288	0,903	1,841
0,100	0,283	0,997	1,952
0,089	0,194	0,592	1,392
0,081	0,239	0,624	1,517
0,081	0,212	0,690	1,606
0,081	0,220	0,725	1,692
0,087	0,225	0,607	1,508
0,097	0,244	0,672	1,621
0,094	0,254	0,723	1,741
0,089	0,263	0,781	1,771

Vypočtené hodnoty

Přesnost pro celý rozsah

0,09

Relativní přesnost pro celý rozsah (%)

12,72

4. Srovnání „novosti postupů“

ELISA metoda pro detekci specifických protilátek proti lidskému choriovému gonadotropinu u koček není komerčně dostupná.

5. Popis uplatnění funkčního vzorku

ELISA metoda pro stanovení specifických protilátek proti lidskému choriovému gonadotropinu v séru koček je používán v laboratoři autorů k výzkumným účelům.

Potenciál dalšího využití metody je v komerčním stanovení protilátek v sérech kočkovitých šelem např. chovaných v ZOO. Indikací pro takovéto vyšetření je zejména selhání účinnosti aplikace preparátu obsahujících hCG.

6. Ekonomické aspekty

Metoda je na pracovišti autorů zavedena a připravena k použití. Komerční využití záleží na poptávce potencionálních zákazníků. V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout. Cena jednotlivých vyšetření bude závislá na množství vyšetřených vzorků.

7. Seznam použité literatury

Adams H. R. (2001): Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State University Press; 8th Revised edition.

Casarini L., Lispi M., Longobardi S., Milosa F., La Marca A., Tagliasacchi D., Pignatti E., Simoni M. (2012): LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling; PLoS One. 7, e46682.

- Pelican, K.M., Wildt, D.E., Pukazhenth, B., Howard, J. (2006): Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*, 66, 37-48.
- Rodrigues da Paz R.C., Dias E.A., Adania C.H., Barnabe V.H., Barnabe R.C. (2006): Ovarian response to repeated administration of alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrinus (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, 66, 1787-1789.
- Swanson W.F., Horohov D.W., Godke R.A. (1995): Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *J. Reprod. Fertil.*, 105, 35-41.
- Swanson W.F., Roth T.L., Graham K., Horohov D.W., Godke R.A. (1996): Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *Am. J. Vet. Res.*, 57, 302-307.
- Swanson, W.F. (2006): Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, 66, 49-58.
- Trojan S. a kol. (2003): *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing a.s., 4. vydání, Praha.
- Viswanah G., Chatterjee S., Roy P. (2007): Assessment of luteinizing hormone receptor function in an endometrial cancer cell line, Ishikawa cells in response to human chorionic gonadotropin (hCG) *Mol Cell Endocrinol.* 272, 14-21.
- Yu N., Xu W., Jiang Z., Cao Q., Chu Y., Xiong S. (2007): Inhibition of tumor growth *in vitro* and *in vivo* by a monoclonal antibody against human chorionic gonadotropin β . *Immunol Lett.*, 114, 94-102.

8. Dedikace

Funkční vzorek *Nepřímý ELISA test pro stanovení specifických protilátek proti lidskému choriovému gonadotropinu v séru koček* byl vytvořen v rámci projektu LO1218 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU-I.

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Název: **Nepřímý ELISA test pro stanovení specifických protilátek proti lidskému choriovému gonadotropinu v séru koček**

Autoři: Hana Kudláčková
MVDr. et Mgr. Kateřina Horáčková
MVDr. Zora Smržová
MVDr. Eliška Hrabálková
MVDr. Alena Bartošková, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.



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