

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Sestavení a optimalizace testu ELISA pro detekci specifických protilátek proti EHV-1 v krevním séru koní

**Veronika Přichystalová
Jihomoravský kraj**

Brno 2017

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Sestavení a optimalizace testu ELISA pro detekci specifických protilátek proti EHV-1 v krevním séru koní

**Assembling and optimization of an ELISA test for
detection of specific antibodies against EHV-1 in the
serum of horses**

Autoři: Veronika Přichystalová

Škola: Klasické a španělské gymnázium Brno-Bystrc, p. o.,
Vejrostova 2 Brno

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: MVDr. Dobromila Molinková, Ph.D.

Brno 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci Sestavení a optimalizace testu ELISA pro detekci specifických protilátek proti EHV-1 v krevním séru koní vypracovala samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 18. 2. 2017

Podpis:

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat MVDr. Dobromile Molinkové, Ph.D. za pomoc v laboratoři, při sepisování práce a za velikou trpělivost, kterou se mnou měla.

Dále bych pak chtěla poděkovat Prof. MVDr. Vladimíru Celerovi, Ph.D. za poskytnutí prostor pro mou vědeckou činnost.

V neposlední řadě bych pak chtěla poděkovat Mgr. Pavlu Zouharovi a Doc. RNDr. Oldřichu Sychrovi, Ph.D. za pomoc při hledání školitele a také Mgr. Gabriele Petříkové, Ph.D. za pomoc při domluvení navýšení absencí, které jsem potřebovala zvednout kvůli práci na Středoškolské odborné činnosti.

Anotace

Populace koní na celém světě je poměrně často infikována druhově specifickými alfaherpesviry: EHV-1 a EHV-4. Kromě přímého průkazu těchto původců respiračních, neurologických a reprodukčních onemocnění lze použít také nepřímou diagnostiku – detekci specifických protilátek v krevním séru pacienta. Kontakt hostitelského organismu s virem navodí tvorbu protilátek proti široké škále imunogenních epitopů na povrchu viru, ale pouze malá část protilátek má schopnost virus zneutralizovat a zabránit jeho množení v hostitelských buňkách. Takovéto neutralizační protilátky se tvoří například proti epitopům esenciálního glykoproteinu D, který je součástí virového obalu. Glykoprotein D se přímo účastní procesu napadení buňky virem a protilátky jsou schopny tomuto procesu zabránit.

Abychom byli schopni tyto protilátky v séru koní detekovat, byl navržen test ELISA založený právě na peptidu obsahujícím neutralizační epitop glykoproteinu D. Senzitivita a specifita tohoto testu měly být srovnatelné s komerčně dostupnými testy, ale u některých případů byly získány neodpovídající výsledky. Příčin může být několik a k jejich objasnění bude v budoucnu proveden konfirmační virus-neutralizační test.

Klíčová slova

herpesvirus koní, test ELISA, sérologie, glykoprotein D, neutralizační protilátky

Annotation

Horse population worldwide is quite often infected by species-specific alphaherpesviruses: EHV-1 and EHV-4. Besides the direct detection of these agents, which cause respiratory, neurological and reproductive diseases, an indirect diagnosis can also be used – a detection of specific antibodies in the serum of the patient. The contact of the host organism with the virus induces the production of antibodies against a wide variety of immunogenic epitopes on the surface of the virus, yet only a few of the antibodies have the ability to neutralize the virus and prevent its propagation in the host cells. Such neutralizing antibodies are formed, for example against the essential glycoprotein D epitopes: the glycoprotein D is part of the virus envelope. Glycoprotein D is directly involved in the process of the cell infection by the virus and antibodies are able to prevent this process.

In order to detect these antibodies in the horses' serum, the ELISA test based on the peptide containing a neutralizing epitope of glycoprotein D was designed. The sensitivity and the specificity of this test should be comparable with commercially available tests, however, in some cases inadequate results were obtained. There may be several causes for this and in order to clarify them a confirmatory virus-neutralization test will be conducted in future.

Key words

Equine herpesvirus, ELISA test, serology, glycoprotein D, neutralizing antibodies

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
Úvod	10
1 Teoretická část	11
1.1 Obecná charakteristika herpesvirů koní (EHV)	11
1.1.1 Charakteristika alfa herpesvirů	11
1.1.2 Charakteristika gama herpesvirů	12
1.2 Imunologie	13
1.2.1 Nespecifická imunita proti herpesvirům koní.....	13
1.2.2 Specifická imunita proti herpesvirům koní.....	13
1.3 ELISA test.....	14
1.3.1 Základní princip nepřímého testu ELISA pro detekci protilátek proti EHV-1/4 v krevním séru koní	15
1.3.2 Nepřímý diskriminační test ELISA	16
2 Cíl práce	16
3 Materiál	17
3.1 Mikrotitrační deska	17
3.2 Komerční ELISA kity	17
3.2.1 INgezim RINONEUMONITIS R.14,HVE.KI, Ingenasa, Španělsko ...	17
3.2.2 Svanovir EHV1/EHV4-Ab, Svanova, Švédsko.....	18
3.3 Krevní séra koní	18
3.4 PBS pufr.....	18
3.5 Anti-Horse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody od Sigma-Aldrich	19

3.6	Chromogenní substrát	19
3.7	Zastavovací roztok	19
4	Metodika	20
4.1	Postup pro nepřímý nediskriminační test ELISA (kit od firmy Ingezim)....	20
4.1.1	Interpretace výsledků	20
4.2	Postup pro nepřímý diskriminační test ELISA (kit od firmy Svanova).....	21
4.2.1	Interpretace výsledků	21
4.3	Vlastní test ELISA pro detekci protilátek proti EHV-1	22
4.3.1	Odečtení a interpretace výsledků	25
5	Výsledky	26
6	Diskuze	28
7	Závěr	29
8	Seznam použité literatury	30
9	Seznam internetových zdrojů	31
10	Seznam obrázků	32
11	Seznam tabulek	32

Seznam použitých zkratek

AMK – aminokyselina

BSA – bovinní sérový albumin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsRNA – dvouřetězcové vlákno DNA

EHM - Equine herpesvirus myeloencephalopathy

EHV – Equine herpesvirus

ELISA - enzym-linked immunosorbent assay

gD – glykoprotein D

gG – glykoprotein G

HRP – křenová peroxidáza

IgG – imunoglobulin

OD – optická denzita

PBS – fosfátový-pufrovaný fyziologický roztok (phosphate-buffered saline)

TMB - 3.3', 5.5' - Tetramethylbenzidin

Úvod

Cílem této práce je vyvinout a optimalizovat peptidový test ELISA pro detekci specifických protilátek vůči viru EHV-1. Princip vlastního ELISA testu by měl být obdobný, jako u komerčně vyráběného testu od firmy SVANOVA s tím rozdílem, že náš vlastní home-made ELISA test bude pozitivní pouze vůči specifickým protilátkám k EHV-1. V testu bude použit peptid, obsahující neutralizační lineární epitop mezi 4. až 22. aminokyselinou v primární struktuře glykoproteinu D viru EHV-1.

Hlavní výhodou vlastního ELISA testu je cenová dostupnost oproti komerčně vyráběnému testu. Další výhodou je, že díky našemu testu, který je schopen detekovat IgG s neutralizační aktivitou vůči EHV-1, je možné v budoucnu stanovit titry těchto protilátek a odhadnout tak průběh onemocnění u jednotlivých koní nebo míru protektivní postvaccinační imunity.

1. Teoretická část

1.1 Obecná charakteristika herpesvirů koní (EHV)

Herpesviry jsou rozšířená skupina DNA virů patřící do čeledi *Herpesviridae*. Infikují širokou škálu nejrůznějších živočichů. Zvláštním jevem je mimořádná hostitelská specifita těchto virů. Každý herpesvirus má svůj okruh hostitelů, který se může měnit v přírodě i v laboratoři [7]. Mezidruhové přenosy virů jsou však velmi ojedinělé. Infekce herpesviry je celoživotní záležitostí, za což virus vděčí své schopnosti přežít v buňkách hostitelského organismu v latentním stádiu. Virus může být při vhodných podmínkách reaktivován.

Ekvinní herpesviry primárně infikují koně. V současné době je známo u koňovitých 11 herpesvirů [1]. Onemocnění způsobená těmito viry mohou být i naprosto bez příznaků (subklinická), v některých případech však může docházet až k život ohrožujícím stavům. EHV rozlišujeme na dvě základní podskupiny. První skupinou jsou alfaherpesviry, kam řadíme viry EHV-1 a EHV-4, patřící do rodu *Varicellovirus* spolu s virem *Varicella-zoster*, který je původcem planých neštovic a pásového oparu u člověka. Druhou skupinou jsou gamaherpesviry, kam patří EHV-2 a EHV-5. Nejbližší analogii ke gamaherpesvirům má lidský virus Epstein-Barrové způsobující infekční mononukleózu.

1.1.1 Charakteristika alfaherpesvirů

EHV-1 a EHV-4 infikují primárně dýchací cesty, což vede k onemocnění, jehož příznaky jsou horečka, chřadnutí, výtok z nosu, z neurologických příznaků se objevuje zhoršená koordinace, ochrnutí ocasu nebo letargie (pouze však v případě nakažení EHV-1 a tento příznak se vyskytuje pouze výjimečně). S oběma těmito viry se kůň setkává již v raných stádiích života, první protilátky pro imunizaci organismu získává v kolostru klisny. Oba tyto viry jsou si velice podobné a imunitní systém koně si proti nim vytváří protilátky třídy IgG se zkříženou reaktivitou.

Samotný EHV-1 způsobuje abort březích klisen, kdy zmetání se vyskytuje v poslední třetině březosti a u klisny nebývají pozorovány žádné respirační obtíže ani horečka, které by zmetání bezprostředně předcházely, může však dojít k porodu neživotného hříběte. Neurologické onemocnění EHM se vyvíjí pouze u dospělých koní, je charakteristické míšními příznaky a inkubační dobou 2-10 dní.

Onemocnění způsobené samotným EHV-4 primárně způsobuje zánět dýchacích cest neboli rhinopneumonii koní. Inkubační doba je okolo jednoho týdne a onemocnění se vyskytuje nejčastěji u hříbat, v poslední době se objevuje i u mladých závodních koní, což vede k dočasnému vyřazení koně z tréninku a ke značným ekonomickým ztrátám majitele.

V současné době neexistuje žádná specifická léčba pro onemocnění způsobených EHV-1 a EHV-4, infikovaným koním je nařízen pouze klidový režim. U koní s vysokou horečkou se mohou podávat antipyretika. Preventivním opatřením je vakcinace inaktivovanou celovirovou vakcínou a navození stádové postvakcinační imunity.

1.1.2 Charakteristika gamaherpesvirů

Gamaherpesviry jsou detekovány v celosvětové populaci koní a to včetně Islandu, kde je populace koní izolována přes 1000 let [12].

Virus EHV-2 způsobuje u koní všech věkových skupin lehká respirační onemocnění a zánět rohovky. Infekci virem může doprovázet i inapetence, apatie, horečka nejasného původu a další klinické symptomy, u nichž však zatím není EHV-2 prokázán jako jediný a primární původce [5]

Virus EHV-5 také způsobuje respirační onemocnění a pravděpodobně způsobuje multinodulární plicní fibrózu a intersticiální onemocnění plic [14]. Toto onemocnění pak bylo tímto virem i experimentálně vyvoláno [15].

K infekci EHV-2 a EHV-5 dochází u koně v raném věku, nejčastěji prostřednictvím kapénková infekce od dospělých jedinců. Oba viry jsou však v prostředí málo odolné a k nakažení hříbat dochází jen na krátkou vzdálenost.

1.2 Imunologie

Imunitní systém všech savců dělíme z hlediska imunitní odpovědi na dva obranné mechanismy. Prvním mechanismem je nespecifická imunita (vrozená), která nemá paměť a jejíž mechanismus obrany je uložen v DNA živočicha. Její součástí jsou zejména makrofágy a fagocyty (z buněčné složky), dále pak komplement a interferony (z humorální složky). Druhým mechanismem je specifická imunita (získaná), do které řadíme T lymfocyty produkující cytokiny (buněčná složka) a B lymfocyty produkující specifické protilátky imunoglobuliny (humorální složka).

1.2.1 Nespecifická imunita proti herpesvirům koní

Nespecifická imunita a její odpověď není primárně závislá na přítomnosti EHV-1 a reaguje vždy stejně bez ohledu na typ viru. Její primární funkcí je produkce cytokinů, interferonů a aktivace komplementu. Právě interferony interagují se specifickou imunitou organismu a aktivují T a B lymfocyty. Tyto látky jsou produkovány ve fibroblastech a spouští se na základě přítomnosti virové dsRNA. Základním cílem interferonů je minimalizovat výskyt viru v centrální nervové soustavě hostitele.

1.2.2 Specifická imunita proti herpesvirům koní

Nejdůležitější složkou specifické imunity jsou B lymfocyty, které produkují specifické monomerní protilátky IgG proti viru EHV-1. Protilátky IgG se vážou na neutralizační epitopy na glykoproteinech a brání tak přilnutí a vniknutí viru do hostitelské buňky a zároveň regulují především systémovou imunologickou odpověď organismu. Koňské IgG se dělí do sedmi tříd od IgG1 až po IgG7.

Protilátky se začínou vyskytovat 14. den od infekce a největší titr se vyskytuje v séru koně, kterému byla krev odebrána ve 4. týdnu nemoci. Poté titr protilátek klesá relativně pomalu a v krvi je detekovatelný ještě několik týdnů.

Specifická humorální imunita se u koní rozvíjí až po narození. Čerstvě narozená hříbata ve svém těle nemají žádná protilátky IgG vůči virům, neboť protilátky neprostupují přes placentu z matky na plod, a první protilátky mládě přijímá až v kolostru klisny.

Kůň, který prodělá nákazu virem EHV-1, si velice často po první infekci vytvoří specifickou buněčnou imunitu.

1.3 ELISA test

ELISA test (angl. zkratka Enzym-linked immunosorbent assay) je jedním z nejcitlivějších testů na detekci specifických antigenů i protilátek ve vzorku a má využití v širokém spektru oborů.

Základním principem tohoto testu je prokázat přítomnost specifické vazby antigen x protilátka, kdy jedna ze složek je známá a je součástí testu a druhá složka je prokazována v klinickém materiálu, kterým může být například vzorek séra, plazmy, slin, slz apod. Ve veterinární imunologii rozlišujeme základní čtyři typy ELISA testů:

1. Přímý ELISA test, který prokazuje přítomnost antigenu.
2. Nepřímý ELISA test, který prokazuje specifické protilátky.
3. Přímý sendvičový ELISA test, který prokazuje antigen.
4. Nepřímý sendvičový ELISA test, který prokazuje specifické protilátky.

1.3.1 Základní princip nepřímého testu ELISA pro detekci protilátek proti EHV-1/4 v krevním séru koní

Při nepřímém ELISA testu se specifické protilátky třídy IgG, produkované imunitním systémem hostitele, po setkání s EHV-1/4 naváží na tento virus, který je fixován na pevném nosiči, vyrobeném nejčastěji z polystyrenu. Po promytí následuje přidání konjugátu, který obsahuje křenovou peroxidázu (HRP) se schopností pevně se vázat na IgG koně. Po opětovném promytí následuje přidání substrátu, tedy látky, která je HRP rozkládána za vzniku barevné reakce a dochází k modrému zbarvení. Reakce je pozastavena přidáním zastavovacího roztoku a intenzita barvy se již nemění.

Změřením intenzity zbarvení (absorbance světla) u jednotlivých vzorků získáváme číselné hodnoty v rozsahu: pozitivní (došlo k navázání protilátek na antigen, k vazbě konjugátu na protilátky a k chemické barevné reakci), dubiozní (protilátek v krevním séru bylo málo anebo se vyskytla nespecifická reakce – nutno opakovat odběr) a negativní (nedošlo k žádné ze specifických vazeb a tedy ani k reakci enzym – substrát).

Výsledky mohou být vyhodnoceny i bez spektrometru, pro přesné výsledky se však používá spektrometr zvaný ELISA reader.

Existují dva typy nepřímého ELISA testu. Prvním typem je nepřímý nediskriminační ELISA test, u kterého není možné rozlišit, zdali kůň vlastní protilátky proti EHV-1 nebo proti EHV-4. Antigenem, fixovaným k mikrotitrační destičce, je v tomto případě celý virus EHV-1 a protilátky z koňského séra, které se na něj specificky váží, vykazují zkříženou reaktivitu s virem EHV-4. Proto u pozitivních jedinců nelze rozlišit, kterým virem jsou infikováni. Tento kit je vyráběn firmou Ingezim RINONEUMONITIS R.14.HVE.K1, Ingenasa, Španělsko.

Druhým typem je poté nepřímý diskriminační ELISA test.

1.3.2 Nepřímý diskriminační test ELISA

Bylo zjištěno, že protilátky specifické pro oba viry bez zkřížené reaktivity jsou namířeny proti IgG jenž se u obou virů liší. Jsme tedy podle výsledků vyšetření schopni rozlišit vir EHV-1 a EHV-4. Tento test je vyráběný švédskou firmou Svanova.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo sestavit a ověřit sérologický test (peptidová ELISA) pro přesné určení titru neutralizačních protilátek proti EHV-1 v krevním séru koní.

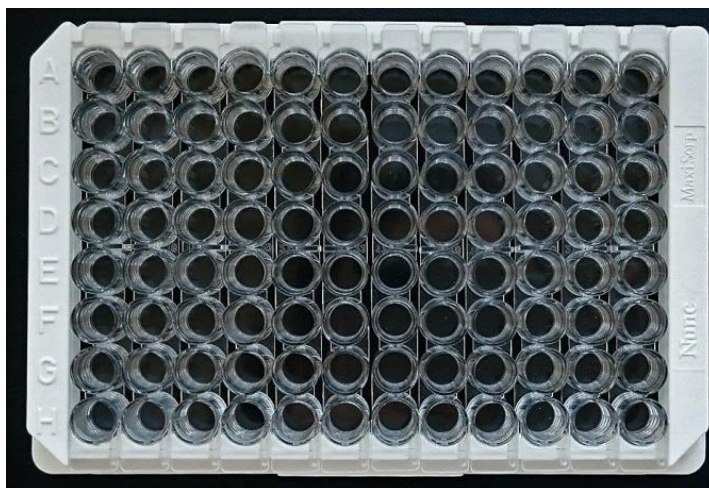
Dílčí cíle:

1. Výběr syntetického peptidu *in silico* tak, aby obsahoval předpokládaný neutralizační epitop viru EHV-1 a mohl být použit pro testování přítomnosti neutralizačních protilátek proti tomuto patogenu
2. Vyšetřit 64 vzorků krevního séra koní z různých chovů dostupnými komerčními testy. Na základě získaných výsledků zvolit soubor 9 sér pro testování peptidového testu ELISA
3. Zavést a optimalizovat test ELISA pro běžné použití na pracovišti virologie ÚICHM, VFU-Brno

3. Materiál

3.1 Mikrotitrační deska

V mikrotitrační desce probíhá celý ELISA test. Mikrotitrační deska sestává z 96 mikrotitračních jamek, které jsou uspořádány do 12 sloupců a 8 řad. Na dně každé jamky je navázán celovirový antigen EHV-1 a EHV-4 (jako v případě ELISA testu od firmy Ingezim), rekombinantní glykoprotein (diskriminační test firmy Svanova) nebo synteticky vyrobený peptid (jako v případě našeho home-made ELISA testu, kde je navázán peptid obsahující neutralizační epitop gD EHV-1).



Obr. 1

Mikrotitrační deska pro test ELISA od firmy Nunc MaxiSorp

3.2 Komerční ELISA kity

3.2.1 INgezim RINONEUMONITIS R.14.HVE.K1, Ingenasa, Španělsko (dále jen Ingezim)

Antigenem na desce je celý virus EHV. Díky křížové reaktivitě protilátek s antigeny obou virů 1 i 4 pozitivní výsledek nerozlišuje, proti kterému z obou virů je testovaný kůň imunní.

3.2.2 Svanovir EHV1/EHV4-Ab, Svanova, Švédsko (dále jen Svanova)

Test využívá antigenní rozdílnosti glykoproteinů G (gG) EHV-1 a EHV-4. Rekombinantní gG1 a gG4 jsou navázány v oddělených sloupcích jamek mikrotitrační destičky, díky čemuž u jednoho séra můžeme rozlišit protilátky proti EHV-1 a EHV-4.

3.3 Krevní séra koní

Bylo vybráno 64 krevních sér koní z různých chovů a oblastí České republiky. Soubor 9 sér pro testování home-made ELISA byl vybrán z těchto sér na základě jejich vyšetření komerčními kity na přítomnost protilátek proti oběma virům (EHV-1 i EHV-4). Byla to séra označená: 870 a 871 (silně pozitivní na EHV-4), 828 a 925 (středně pozitivní na EHV-1 i EHV-4), 852 a 930 (negativní na EHV-1 i EHV-4). Sérum 390 bylo pozitivní pouze na EHV-1 a bylo odebráno koni ve čtyřech časových intervalech. První sérum (390/1) bylo odebráno koni s klinickými příznaky onemocnění EHV-1 v září roku 2008, druhé (390/2) bylo odebráno za 14 dní, třetí v listopadu téhož roku a poslední v dubnu roku 2009. Jmenovaná séra byla použita na konečný test, který má prokázat reaktivitu pouze na EHV-1.

3.4 PBS pufr

Pufr PBS je vodný roztok hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 10 mmol/L a chloridu sodného o koncentraci 137 mmol/L. Pufr PBS je netoxický pro většinu buněk a proto má v biologii značné využití. Při našem testu byl využit jako ředící roztok a zároveň jako promývací roztok spolu s disperzním činidlem Tween 20 (Sigma) v koncentraci 0,02%.

3.5 Anti-Horse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody od Sigma-Aldrich

Tento konjugát je protilátka proti celé imunoglobulinové molekule izotopu G koně. Tato protilátka je značena (konjugována) enzymem křenovou peroxidázou. Využívá se pro vyhledávání a ke specifickému označení všech IgG koně ve vzorku. Konjugát je králíčího původu. V našem testu byl vyzkoušen v koncentraci 1:10 000 (doporučeno výrobcem) a v koncentraci 1:30 000.

3.6 Chromogenní substrát

Jednou z reakčních složek substrátu je TMB, což je chromogen pro vizualizaci aktivity v testu ELISA, obsahujícím peroxidázový konjugát.

K enzymatické reakci dojde při reakci molekul křenové peroxidázy s peroxidem vodíku, který je jednou ze složek substrátu. Při reakci vzniká kyslík, který způsobí redukci TMB a tato redukce se projeví změnou zbarvení (dojde ke zmodrání). Intenzita zbarvení závisí na množství křenové peroxidázy přichycené na konjugát. Z toho vyplývá, že čím větší počet molekul koňského antigenu IgG s navázaným konjugátem, tím k větší reakci dochází a tudíž intenzita zbarvení je výraznější.

Doporučená vlnová délka pro fotometrické odečítání intenzity zbarvení je 450 nm po zastavení reakce zastavovacím roztokem.

3.7 Zastavovací roztok

Zastavovací roztok slouží k zastavení chromogenní reakce TMB v ELISA testu (po přidání dochází ke změně z modrého na žluté zbarvení). Hlavní reakční složkou roztoku je 1M H₂SO₄, dále jsou v roztoku obsaženy činidla pro zvýšení rozpustnosti a stálosti barvy.

4. Metodika

4.1 Postup pro nepřímý nediskriminační test ELISA (kit od firmy Ingezim)

Všechna činidla (kromě konjugátu) musí být před použitím zahřáta na pokojovou teplotu.

Na mikrotitrační desce je řádek A určen pro pozitivní kontrolu, která je do každé jamky přidána po 100 μ l, řádek B je pak určen pro negativní kontrolu přidávanou ve stejném množství. Pro přípravu vzorků se nejprve naředí “serum diluent“ v destilované vodě v poměru 1:5, následně se pak séra ředí v tomto roztoku v poměru 1:100 a po 100 μ l jsou přidávána do jednotlivých jamek. Vzorky se nechají inkubovat 60 minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci se 4x promyjí roztokem Washing solution, který je ředěn v poměru 1:25. Následuje přidání 100 μ l konjugátu do každé jamky. Konjugát je zředěn v poměru 1:100 v ředícím roztoku. Vzorky se inkubují po dobu 30 minut při teplotě 25 °C. Deska se poté opět 5x promyje roztokem Washing solution a přidá se 100 μ l substrátu ředěného v příslušném pufru v poměru 1:10. Deska se ponechá 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí stanovené doby se přidá do každé jamky 100 μ l zastavovacího roztoku k ukončení reakce. Zastavovací roztok se přidává do jamek ve stejném pořadí jako substrát.

4.1.1 Interpretace výsledků

Výsledky jsou vyhodnoceny pomocí spektrometru s vlnovou délkou nastavenou na 405 nm. Test se považuje za průkazný, pokud OD hodnota pozitivní kontroly je vyšší jak 0.8 a OD hodnota negativní kontroly je nižší jak 0.3. Následně se od pozitivní kontroly odečte hodnota negativní kontroly + 0.3 a od negativní kontroly se odečte hodnota negativní kontroly + 0.2. Všechny vzorky s OD hodnotou vyšší než je hodnota vypočtené horní hranice se považují za pozitivní, vzorky s OD hodnotou nižší než je hodnota vypočtené dolní hranice se považují za

negativní. Vzorky, jejichž hodnota je mezi těmito výsledky, se považují za dubiózní a u těchto koní se doporučuje provést ELISA test opět po 10 až 14 dnech.

4.2 Postup pro nepřímý diskriminační test ELISA (kit od firmy Svanova)

Postup u diskriminačního testu ELISA je obdobný jako u nediskriminačního kitu, zároveň jsme také z výsledků diskriminačního testu schopni určit, zdali má kůň protilátky vůči EHV-1 nebo EHV-4, případně jestli má v těle protilátky proti oběma virům.

Všechna činidla a séra musí mít před použitím teplotu 18-25 °C. Před zahájením testu je také vhodné označit si každý sloupec mikrotitrační desky číslem. Sloupce obsahují 1. antigen EHV-1, 2. antigen EHV-4 a 3. irelevantní kontrolní antigen. Do třech řad sloupců se vždy odměří 100 µl pozitivní kontroly 1/4, pozitivní kontroly 4 a negativní kontroly. Do zbylých jamek přijdou testovaná séra po 100 µl předředěná 1:100 v "sample/conjugate dilution buffer". Následně se vzorky inkubují 2 hodiny při teplotě 18-25 °C za stálého třepání. Po inkubaci se vzorky 4x vymyjí roztokem PBS-Tween Buffer, ředěném v poměru 1:20. Následuje přidání 100 µl konjugátu s křenovou peroxidázou, který je ředěný v poměru 1:120 000. Vzorky se poté inkubují 1 hodinu při teplotě 18-25 °C za stálého třepání, po inkubaci se promyjí 4x roztokem PBS-Tween Buffer. Do každé jamky se poté přidá 100 µl chromogenního substrátu a vzorky se ponechají 10 minut v klidu při pokojové teplotě. Následuje odměření 50 µl zastavovacího roztoku do každé jamky a přidání ve stejném pořadí, jako byl přidáván substrát.

4.2.1 Interpretace výsledků

Výsledky jsou vyhodnoceny na spektrometru s nastavenou vlnovou délkou na 450 nm. Vyhodnocení na ELISA readeru by mělo proběhnout nejpozději do 15 minut od přidání zastavovacího roztoku, aby se zabránilo možnému kolísání výsledků.

Při vyhodnocení výsledků je nutné jako první srovnat hodnotu OD jednotlivých kontrol a vzorků a získat tzv. OD_{Corr} . Proto musí být od $OD_{\text{EHV-1}}$ odečtena hodnota $OD_{\text{CONTROL ANTIGEN}}$, totéž musí být provedeno i s hodnotou $OD_{\text{EHV-4}}$ a se všemi vzorky.

Test se považuje za průkazný, pokud hodnota OD_{Corr} pozitivní kontroly je vyšší než 0.6 a hodnota OD_{Corr} negativní kontroly je nižší než 0.1. Vzorek je považován za pozitivní, pokud je jeho hodnota OD vyšší jak 0.2, negativní vzorek má hodnotu OD nižší než 0.1. Vzorky, které mají hodnotu OD mezi 0.1-0.2, se považují za dubiózní a doporučuje se odebrat koním nové vzorky k dalším testům po 10 až 14 dnech.

4.3 Vlastní test ELISA pro detekci protilátek proti EHV-1

Podle známé aminokyselinové sekvence povrchového glykoproteinu D viru EHV-1 byl *in silico* pomocí prediktivního softwaru navržen syntetický peptid mezi AMK 4-22, který obsahuje lineární imunogenní epitop, proti kterému vytváří hostitelský imunitní systém neutralizační protilátky třídy IgG.

Krok 1: určení optimálního množství peptidu a koncentrace blokovacího roztoku. Peptid byl naředěn v pufru PBS tak, aby bylo obsaženo 0,5 μg , 1 μg , 5 μg a 10 μg v množství 100 μl na jamku. Byl navazován v mikrotitračních deskách (1 deska = 1 koncentrace) 24 hodin při 4 °C. Poté byl obsah jamek odsát a antigen byl blokován roztokem bovinního sérového albuminu v koncentraci A-1%, B-2%, C-3%, D-4% (všechny čtyři koncentrace na každé desce v jednotlivých kvadrantech 6 sloupců x 4 řady) podle obr. 2.

A	B
C	D

Obr. 2

Rozmístění koncentrací BSA na mikrotitrační desce

Blokování probíhalo jednu hodinu při pokojové teplotě a mělo za účel obsadit nespecificky vazná místa v peptidu. Po vylití blokovačoho roztoku byla v tripletech napipetována séra s definovaným obsahem protilátek: K – pozitivní kontrola EHV-1/4 (z kitu Svanova), L – pozitivní kontrola EHV-4 (z kitu Svanova), M – negativní, N – negativní terénní sérum 852. Séra se přidávala vždy do tří jamek jedné řady a byla ředěna v PBS pufru + 2,5% BSA, v koncentraci 1:50 a 1:100 podle obr. 3 a byla inkubována 30 minut při 37 °C.

K		
L		
M	A	B
N		
K		
L		
M	C	D
N		

Obr. 3

Schéma rozmístění koncentrací jednotlivých sér

Desky byly promyty roztokem PBS + Tween 4x. Do všech jamek pak byl přidán konjugát proti IgG koně (s křenovou peroxidázou) v ředění doporučeném výrobcem (1:10 000). Inkubace s konjugátem probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Následovalo promytí jamek roztokem PBS + Tween 4x a přidání substrátu. Substrát byl přidán do všech jamek v množství 100 µl a inkubován do vývoje zřetelné barevné reakce. Reakce byla ukončena přidáním 1M H₂SO₄ po 100 µl do každé jamky.

Krok 2: testování souboru 9 sér a jejich titrace. Byla otestována séra 828, 870, 925 a 930 v dvojkovém ředění po čtyřech jamkách každého ředění (viz obr. 4) a cílem bylo zvolit koncentraci séra, která nejlépe odráží množství přítomných protilátek (největší rozdíl pozitivní x negativní).

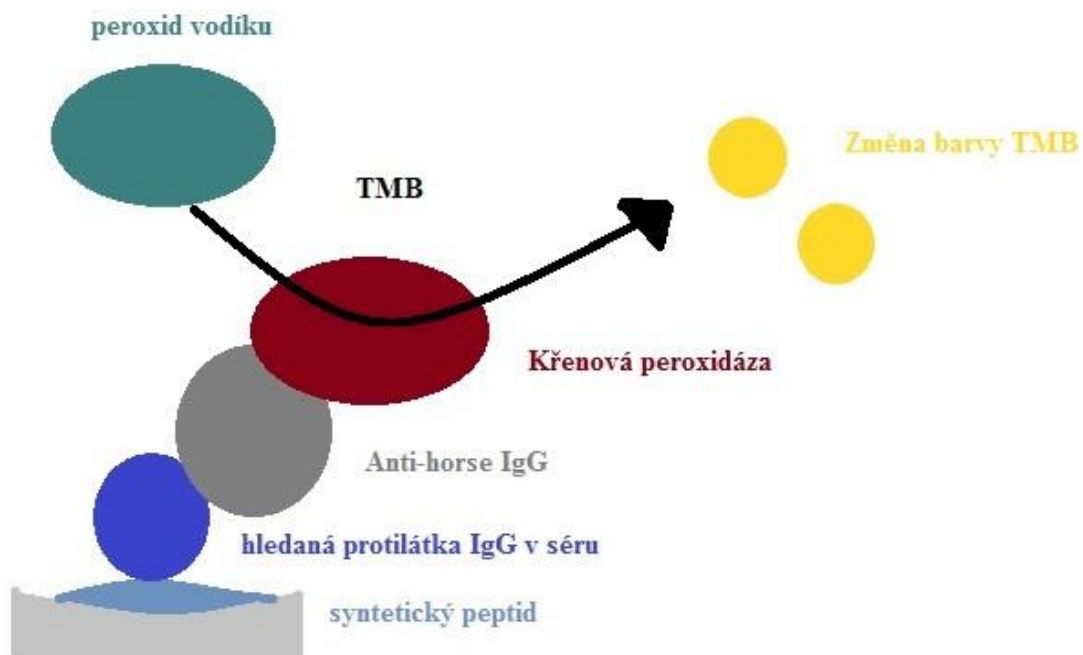
1:10tis	828													870
1:30tis														
1:10tis	925													930
1:30tis														
		1:1600	1:800	1:400	1:200	1:100	1:50	1:1600	1:800	1:400	1:200	1:100	1:50	

Tab. 1

Schéma rozmístění sér 828, 870, 925a 930 s dvojkovým ředěním

Krok 3: testování dvou koncentrací konjugátu Anti-Horse IgG (Sigma). Byly použity dvě koncentrace konjugátu ředěného v pufru PBS + 2,5% BSA a to 1:10 000 a 1:30 000.

Krok 4: otestování souboru všech 9 sér v optimalizovaném testu.



Obr. 4

Schéma vlastního ELISA testu

4.3.1 Odečtení a interpretace výsledků

Optická denzita (síla reakce) byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Mezi jednotlivými variantami ředění antigenu, blokovacího roztoku a sér byly vybírány ty kombinace, které dávaly u jednotlivých sér, v souladu s testováním komerčními testy ELISA, nejlepší výsledky a v našem testu vykazovaly největší rozdíly hodnot absorbance mezi pozitivními a negativními séry. Pro další kroky bylo vybráno ředění BSA s nejlepším účinkem.

5. Výsledky

Dílčí výsledek č. 1: na základě dostupné literatury a programem IEDB Analysis Resource [11] byl vybrán peptid 19-ti mer o sekvenci CEKAKRAVRGRQDRPKEFP.

Dílčí výsledek č. 2: bylo vyšetřeno 64 krevních sér koní z různých oblastí a různých typů chovu v České republice. Bez ohledu na vakcinační anamnézu jsme potvrdili plošnou sérologickou pozitivitu testovaných koní proti EHV-4 (87,9 %) a jen nízkou pozitivitu protilátek proti EHV-1 (12,1 %). Výjimečně se vyskytovaly případy dvojité negativních jedinců.

Dílčí výsledek č. 3: po sérii testů byla stanovena nejvhodnější koncentrace antigenu navázaného v jamkách. Koncentrace byla stanovena na 0,5 µg antigenu na 100 µl PBS pufru na jamku. Zároveň byla stanovena i koncentrace konjugátu rozpuštěného opět v PBS pufru na poměru 1:20 000.

Po stanovení vhodných koncentrací antigenu a konjugátu jsme udělali sérii testů na stanovení positivity EHV-1 u jednotlivých sér. Nejprve jsme vybrali vhodné ředění sér v PBS pufru, které bylo stanoveno na poměr 1:400. Poté jsme se snažili o vytvoření takového testu, který by nejsilněji reagoval na antigeny vůči EHV-1.

V našem home-made ELISA testu bylo pořadí jednotlivých sér následující: 390/2 (sloupec 8 a 9), 870 (sloupec 1 a 2), 390/4 (sloupec 11), 390/3 (sloupec 10), 390/1 (sloupec 6 a 7), 871 (sloupec 3), 828 (sloupec 4) a 930 (sloupec 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	3,435	3,441	2,9068	2,6005	1,2405	3,0627	2,9649	3,6822	3,4952	3,1233	3,3478
B	3,0484	2,6615	1,8236	1,9311	0,86	2,4787	2,2625	3,2596	3,126	2,5439	2,612
C	2,2595	2,0179	1,2013	1,3381	0,6263	1,8127	1,6388	2,7222	2,4545	1,7277	1,9612
D	1,6545	1,5023	0,8554	1,0927	0,5246	1,229	1,1383	2,1567	1,9034	1,3346	1,5349
E	1,1807	1,1122	0,6875	0,7485	0,5499	0,9638	0,7835	1,5404	1,3067	1,023	1,0303
F	0,8197	0,7874	0,6239	0,6102	0,5358	0,7347	0,6242	1,184	1,012	0,7165	0,7498

Tab. 2

Tabulka s výsledky na pozitivitu EHV-1 vyšetřených na home-made ELISA testu (červenou jsou označena silně pozitivní séra, zelenou naopak negativní séra)

Kromě séra 870, které je silně pozitivní na EHV-4, výsledky odpovídaly seřazení jednotlivých sér od nejvíce pozitivního na EHV-1 po negativní.

Následovala kontrola s použitými séry na diskriminačním testu od firmy Svanova a na nediskriminačním testu od firmy Ingezim.

Číslo vzorku	Ingezim	Svanova EHV-1/EHV-4	Home-made ELISA (EHV-1)
870	Pozitivní (+++)	Dubiózní/Pozitivní (++++)	Pozitivní (++++)
871	Pozitivní (++++)	Dubiózní/Pozitivní (+++)	Pozitivní (+++)
828	Pozitivní (++)	Pozitivní (++)/Pozitivní (++)	Pozitivní (++)
925	Pozitivní (++)	Pozitivní (+)/Pozitivní (++)	Pozitivní (+)
930	Negativní	Dubiózní/Dubiózní	Negativní
390/1	Pozitivní (++)	Negativní/Pozitivní (+)	Pozitivní (++)
390/2	Pozitivní (++++)	Negativní/Pozitivní (++)	Pozitivní (++++)
390/3	Pozitivní (++++)	Negativní/Pozitivní (++)	Pozitivní (++++)
390/4	Pozitivní (++++)	Dubiózní/Pozitivní (+++)	Pozitivní (++++)

Tab. 3

Porovnání výsledků z testů ELISA od Ingezim, Svanova a Home-made ELISA

6. Diskuze

Pro zjištění titru virus-neutralizačních protilátek v séru testovaného zvířete je celosvětově užívaným standardem virus-neutralizační test [11]. Stejně tak je tomu i u ekviních herpesvirů. Tento test je ovšem náročný na přesnost provedení a vyžaduje prostory pro práci s buněčnými kulturami, cenově náročný materiál a jeho provedení je po časové stránce zdlouhavé. Proto se laboratoř virologie ÚICHM, VFU-Brno rozhodla sestavit citlivý a rychlý test pro přibližné stanovení množství neutralizačních protilátek proti EHV-1 v séru koní a to jako doplňkový test k projektu, který se zabývá genetickou predispozicí koní k onemocněním způsobeným herpesviry [10]. Dostupné komerční testy ELISA obsahují celý antigen viru EHV nebo glykoprotein G (1/4), ovšem ani z jednoho z těchto testů nelze odvodit míru ochranné protilátkové imunity, protože protilátky proti použitým antigenům se nacházejí převážně na epitopech, které v drtivé většině nemají neutralizační charakter.

Na základě informací získaných z podobných prací na humánních herpesvirech byl navržen peptid, který nejlépe odpovídá účelům tohoto testu.

Zavedení nového peptidového testu a srovnání jeho výsledků s dvěma komerčními testy ELISA přineslo nečekané a rozporuplné výsledky. Ukázalo se totiž, že krevní séra vybraná jako vzorová pro reaktivitu s EHV-1 a s EHV-4, neodpovídají zcela předpokladům. Například séra označená jako 870 a 871, která v testu Svanova (diskriminační test) dávají velmi silnou reakci s EHV-4, ale dubiózní reakci s EHV-1, vyšla jako silně reagující proti antigenu v našem testu ELISA. Jedním z vysvětlení je, že i při použití malého a specifického peptidu může dojít ke zkřížené reaktivitě proti EHV-4. Existuje však i další vysvětlení a to, že dotyčný diskriminační test některé protilátky proti některým kmenům EHV-1 nezachytí. Tento předpoklad by potvrzovala dvě fakta. Jednak skutečnost, že ačkoliv se v České republice vakcinuje vakcínou pouze proti EHV-1, zjištěná séropozitivita je velice nízká (viz výsledky dílčí cíl č. 2). Dále tuto domněnku podporují výsledky koně, jehož sérum bylo označeno číslem 390. Jednalo se o klinicky nemocného pacienta s myeloencefalopatií, který byl předveden na Klinikou chorob koní VFU Brno a během jeho hospitalizace byla provedena kompletní

diagnostika onemocnění včetně přímého průkazu EHV-1, a to jak v nazálním střeru, tak v cirkulujících lymfocytech. U tohoto koně lze tedy předpokládat přítomnost vysokých titrů protilátek právě proti EHV-1. V diskriminačním testu ovšem ve třech ze čtyř vzorků nebyl prokázán vůbec a ve čtvrtém séru byl výsledek pouze dubiózní. Náš test naopak vyhodnotil tři ze čtyř vzorků séra tohoto koně jako nejsilnější z testovaných sér. Test s celovirovým antigenem nám bohužel nepomohl v interpretaci tohoto rozporu, proto bude nutné pro definitivní evaluaci testu vyšetřit zmiňovaný soubor sér virus-neutralizačním testem. Výsledky tohoto vyšetření bohužel přesahují časový rámec této Středoškolské odborné práce.

7. Závěr

Pro zjednodušení sérologického testování a nižší finanční náklady při testování velkého souboru krevních sér koní byl vyvinut test ELISA založený na peptidovém antigenu, který obsahuje neutralizační epitop esenciálního glykoproteinu D EHV-1.

Za tímto účelem byla sestavena sada krevních sér koní vybraná tak, aby reprezentovala různá plemena, pohlaví, typy chovu i oblasti republiky. Byla zjištěna vysoká pozitivita protilátek proti EHV-4 a nečekaně nízká pozitivita protilátek proti EHV-1 komerčním testem. Home-made ELISA test vytvořený v rámci této SOČ může přinést vysvětlení takového nepoměru, protože odhalil protilátky proti EHV-1 i u vzorků, které byly vyhodnoceny diskriminačním testem EHV-1 negativní. Definitivní schválení home-made ELISA testu do projektu, jež na pracovišti probíhá, bude vyžadovat provedení konfirmačního neutralizačního testu.

8. Seznam použité literatury

1. BORCHERS K., Wiik H., Frölich K., Ludwig H., East ML., Antibodies against equine herpesviruses and equine arteritis virus in Burchell's zebras (*Equus burchelli*) from the Serengeti ecosystem. *Journal of Wildlife Diseases*, 2005, 41(1):80-86.
2. CUI X., Cao Z., Chen Q., Arjunaraja S., Snow AL., Snapper CM., Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. *Vaccine*, 2016, 34: 4050-4055.
3. EISENBERG RJ., Long D., Hogue-Angeletti R., Cohen GH., Amino-terminal sequence of glycoprotein D of herpes simplex virus types 1 and 2. *Journal of Virology*, 1984, (1):265-8.
4. FLOWERS CC., O'Callaghan DJ., Equine herpesvirus 1 glycoprotein G: mapping of the transcript and a neutralization epitope. *Journal of Virology*, 1992, 66(11):6451-60.
5. FORTIER G., van Erck E., Pronost S., Lekeux P., Thiry E., Equine gammaherpesviruses: pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *The Veterinary Journal*, 2010, 186(2):148-56.
6. HARTLEY CA., Dynon KJ., Mekuria ZH., El-Hage CM., Holloway SA., Gilkerson JR., Equine gammaherpesviruses: perfect parasites? *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(1-2):86-92.
7. KLAPÁČOVÁ, Olga. Infekce psů herpes virem. Praha, 2014. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Katedra zoologie a rybářství.
8. MOLINKOVÁ, Dobromila. Příprava a charakterizace rekombinantních protilátek proti glykoproteinu D herpesviru koní 1 (EHV-1). Brno, 2005. Dizertační práce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Ústav mikrobiologie a imunologie.
9. RUITENBERG KM., Gilkerson JR., Wellington JE., Love DN., Whalley JM., Equine herpesvirus 1 glykoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of EHV-1 disease. *Virus Research*, 2001, 79(1-2):125-35.

10. RUSEK J., Klumplerova M., Molinkova D., Sedlinska M., Dusek L., Muzik J., Putnova L., Vrtkova I., Celer V., Horin P., Genetics of anti-EHV antibody responses in a horse population. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95(1):137-142
11. THOMSON GR., Mumford JA., Campbell J., Griffiths L., Clapham P., Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Veterinary Journal*, 1976, 8(2):58-65.
12. THORSTEINSDÓTTIR L., Torfason EG., Torsteinsdóttir S., Svansson V., Isolation and partial sequencing of Equid herpesvirus 5 from a horse in Iceland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2010, 22(3):420-23.
13. TOMAN, Miroslav. *Veterinární imunologie. 2., dopl. a aktualiz. vyd.* Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2464-5.
14. WILLIAMS KJ., Maes R., Del Piero F., Lim A., Wise A., Bolin DC., Caswell J., Jackson C., Robinson NE., Derksen F., Scott MA., Uhal BD., Li X., Youssef SA., Bolin SR., Equine multinodular pulmonary fibrosis a newly recognized herpesvirus-associated fibrotic lung disease. *Veterinary Pathology*, 2007, 44(6):849-62.
15. WILLIAMS KJ., Robinson NE., Lim A., Brandenberger C., Maes R., Behan A., Bolin SR., Experimental induction of pulmonary fibrosis in horses with the gammaherpesvirus equine herpesvirus 5. *PLoS One*, 2013, 8(10).
16. ZHANG Y., Smith PM., Tarbet EB., Osterrieder N., Jennings SR., O'Callaghan DJ., Protective immunity against herpesvirus type-1 (EHV-1) infection in mice induced by recombinant EHV-1 gD. *Virus Research*, 1998, 56(1):11-24

9. Seznam internetových zdrojů

- I1. <http://tools.iedb.org/bcell/>

10. Seznam obrázků

Obr. 1: Mikrotitrační deska pro test ELISA od firmy Nunc MaxiSorp

Obr. 2: Rozmístění koncentrací BSA na mikrotitrační desce

Obr. 3: Schéma rozmístění koncentrací jednotlivých sér

Obr. 4: Schéma vlastního ELISA testu

11. Seznam tabulek

Tab. 1: Schéma rozmístění sér 828, 870, 925a 930 s dvojkovým řaděním

Tab. 2: Tabulka s výsledky na pozitivitu EHV-1 vyšetřených na home-made ELISA testu

Tab. 3: Porovnání výsledků z testů ELISA od Ingezim, Svanova a Home-made ELISA