

## Blokujący test ELISA do wykrywania przeciwciał przeciwko hemaglutyninie wirusów grypy serotypu H5

### OPIS TECHNOLOGII

Przedmiotem Technologii jest blokujący test ELISA, bELISA H5, do wykrywania przeciwciał przeciwko hemaglutyninie (HA) wirusów grypy serotypu H5 w surowicy kurcząt. Test jest produkowany w postaci zestawu, który zawiera wszystkie reagenty i odczynniki niezbędne do jego wykonania. Kluczowym składnikiem testu są mysie przeciwciała monoklonalne (mAb) G-7-27-18, wytworzone metodą hybrydom. Linia komórkowa hybrydomy G-7-27-18 produkującej mAb G-7-27-18 jest zdeponowana w DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) w Brunshwiku. Test bELISA H5 zawiera mAb G-7-27-18 oczyszczone z nadsączy hodowli hybrydomy G-7-27-18. Płytki mikrotitracyjne testu są opłaszczane białkiem HA z sekwencją polskiego izolatu wirusa wysoko patogennej grypy ptaków H5N1, które wyprodukowano w bakulowirusowym systemie ekspresji w ramach usługi zewnętrznej (Oxford Expression Technologies Ltd., Wielka Brytania). Pozostałe składniki testu przygotowywane są przy użyciu komercyjnie dostępnych reagentów i odczynników. Zgodnie ze wstępną oceną test bELISA H5 spełnia kryteria testu diagnostycznego do wykrywania przeciwciał przeciwko HA wirusów grypy serotypu H5 w surowicy kurcząt.

### PODSTAWOWE DANE

- ✓ BRANŻA: diagnostyka, epidemiologia
- ✓ WŁASNOŚĆ: Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej (Łukasiewicz – IChP) 95%, Uniwersytet Gdański 5%
- ✓ FORMA OCHRONY: P-418 671, zgłoszenie PCT/PL2017/000084
- ✓ POZIOM GOTOWOŚCI WG TRL: 4
- ✓ ŹRÓDŁO FINANSOWANIA/ROK: subwencja na komercjalizację
- ✓ SZACUNKOWY CZAS DO WDROŻENIA: 5 lat

### ZASTOSOWANIE

Test bELISA H5 może być wykorzystany w diagnostyce zakażeń wirusami grypy serotypu H5 oraz do odróżnienia zwierząt zakażonych od szczepionych w programach szczepień przeciwko grypie ptaków jako tzw. test DIVA (ang. differentiation of infected from vaccinated animals). Zależnie od zakresu badań walidacyjnych, test mógłby być przeznaczony do analizy surowicy kurcząt lub dodatkowo innych gatunków ptactwa domowego, takich jak gęsi, kaczki czy indyki. Potencjalnie technologia może być wykorzystana do opracowania testu do diagnostyki ludzi w kierunku zakażenia wirusami grypy serotypu H5.

## Blokujący test ELISA do wykrywania przeciwciał przeciwko hemaglutyninie wirusów grypy serotypu H5

### PRZEBIEG PROCESU

Test bELISA H5 do wykrywania przeciwciał przeciwko HA H5 w surowicy kurcząt jest produkowany w postaci zestawu. Produkcja testu bELISA H5 obejmuje następujące etapy:

- ✓ hodowla hybrydomy G-7-27-18 i oczyszczenie mAb G-7-27-18 z nadsączy hodowli metodą chromatografii powinowactwa w skali laboratoryjnej,
- ✓ wytworzenie białka HA z sekwencją polskiego izolatu wirusa wysoko patogennej grypy ptaków H5N1
- ✓ w bakulowirusowym systemie ekspresji w ramach usługi (Oxford Expression Technologies Ltd., Wielka Brytania),
- ✓ opłaszczenie płytek mikrotitracyjnych rekombinowanym białkiem HA H5 i zablokowanie niespecyficzných miejsc wiązania na płytkach,
- ✓ przygotowanie reagentów i odczynników niezbędnych do wykonania testu z wykorzystaniem mAb G-7-27-18 oraz komercyjnie dostępnych reagentów i odczynników,
- ✓ przygotowanie prób do oceny poprawności wykonania testu (kontrola pozytywna i negatywna).

### KONKURENCYJNOŚĆ

Testy ELISA w formacie kompetycyjnym (cELISA) lub blokującym (bELISA) do wykrywania przeciwciał przeciwko HA H5 są powszechnie stosowane w diagnostyce zakażeń wywołanych przez wirusy grypy serotypu H5 oraz do odróżnienia zwierząt zakażonych od szczepionych w programach szczepień przeciwko grypie ptaków. Kluczowym reagentem tych testów są mAb przeciwko HA H5. Zakres aktywności przeciwciał wobec antygenów HA determinuje wartość diagnostyczną testu.

MAb G-7-27-18 wykorzystane do produkcji testu bELISA H5 mają szeroki zakres specyficzności wobec HA H5 nisko- i wysokopatogennych wirusów grypy, nie reagują krzyżowo z HA pozostałych serotypów (H1-H4 i H6-H16) i rozpoznają natywne formy antygenów. Przeciwciała nie są aktywne w testach zahamowania hemaglutynacji (HI). Epitopy dla MAb G-7-27-18 są prawdopodobnie silnie konserwowane w antygenach HA H5 i nie ulegają zmianom pod wpływem presji selekcyjnej przeciwciał HI. Przewidywalnie test z użyciem mAb G-7-27-18 będzie wykrywał infekcje wywołane przez aktualnie krążące i nowe szczepy wirusów grypy serotypu H5.

Analiza surowic kurcząt potwierdziła, że test testu bELISA H5 prawidłowo różnicuje surowice anty-H5 pozytywne i anty-H5 negatywne i nie wykazuje reakcji krzyżowych z antysurowicami przeciwko wirusom grypy serotypów innych niż H5 (H1-H4 i H6-H16). Test charakteryzuje dobra powtarzalność (RSD: 7,1% – 10,0%), wysokie wskaźniki specyficzności analitycznej (Asp: 100%) oraz specyficzności i czułości diagnostycznej (Dsp: 97,6%; Dse 1: 98,0%; Dse 2: 99,1%). Test bELISA H5 może stanowić alternatywę dla testów obecnych na rynku. Niektóre z nich, np. test FluAC H5 (IDVet, Francja), mają ograniczoną zdolność do wykrywania infekcji wywołanych przez odległe antygenowo szczepy wirusa. Inne mogą okazać się nieskuteczne w diagnostyce zakażeń nowymi szczepami wirusa. Technologia dostarcza nowy test ELISA do wykrywania przeciwciał przeciwko HA H5. Jest odpowiedzią na zapotrzebowanie na wysoce specyficzne narzędzia analityczne dla diagnostyki i nadzoru epidemiologicznego wirusów grypy.

### RYNEK/REFERENCJE

Testy do oznaczania przeciwciał przeciwko hemaglutyninie H5 wirusów grypy są dostępne na rynku. Należy do nich test „ID Screen Influenza H5 Antibody Competition” (IDVet, Francja).