



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Olgerd Babkin

Zoonotinio hepatito E viruso nustatymo metodų kūrimas

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos programa

Darbo vadovas:

Dr. Martynas Simanavičius

Darbas atliktas:

Gyvybės mokslų centre

Biotechnologijos instituto

Imunologijos skyriuje

Vilnius, 2026 m.

Zoonotinio hepatito E viruso nustatymo metodų kūrimas

Magistro darbas rengtas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos
instituto Imunologijos skyriuje

Olgerd Babkin



/parašas/

Darbo vadovas:

Dr. Martynas Simanavičius



/parašas/

2026-01-06

Turinys

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 HEV klasifikacija	9
1.2 HEV istorija ir epidemiologija	9
1.3 HEV zoonozės	11
1.4 HEV genomo struktūra ir replikacija	13
1.5 Hepatito E klinikiniai simptomai	15
1.6 Imunocheminiai HEV nustatymo metodai	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	21
2.1 Medžiagos	21
2.1.1 Ląstelių linijos	21
2.1.2 Reagentai	21
2.1.3 Ląstelių auginimo terpės	22
2.1.4 Tirpalai ir terpės	22
2.1.5 Antriniai antikūnai	23
2.1.6 Rekombinantiniai baltymai	23
2.2 Įranga, prietaisai ir priemonės	23
2.3 Metodai	25
2.3.1 Monokloninių antikūnų paruošimas	25
2.3.1.1 Ląstelių atšildymas, kultivavimas ir kriokonservavimas	25
2.3.1.2 Antikūnų gryninimas afinine chromatografija	25
2.3.2 Imunocheminiai analizės metodai	26
2.3.2.1 Netiesioginė imunofermentinė analizė	26
2.3.2.2 Imunoprecipitacija	26
2.3.2.3 Imunoblotingas	27
2.3.3 Imunocheminiai biologinių mėginių analizės metodai	28
2.3.3.1 HEV kapsidės baltymų imunoprecipitacija žiurkių ir šernų kepenų mėginiuose	28
2.3.3.2 Žiurkių HEV specifinių antikūnų nustatymas žiurkių mėginiuose	28

2.3.3.3 Žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymas žmonių kraujo serumo mėginiuose	29
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1 Monokloninių antikūnų paruošimas	30
3.1.1 Hibridomų auginimas ir stabilizavimas	30
3.1.2 Monokloninių antikūnų gryninimas ir aktyvumo nustatymas	31
3.2 Imunoprecipitacijos metodo HEV nustatymui kūrimas	33
3.2.1 IP magnetinėmis dalelėmis protokolo optimizavimas	34
3.2.2 IP sefarozės dalelėmis protokolo optimizavimas	37
3.3 Serologinių sistemų HEV nustatymui kūrimas	44
3.3.1 IFA metodo taikymas antikūnų nustatymui laukinių žiurkių mėginiuose	46
3.3.2 IFA metodo taikymas antikūnų nustatymui žmonių mėginiuose	48
IŠVADOS	50
SANTRAUKA	51
ABSTRACT	52
PADĖKA	53
LITERATŪROS SĄRAŠAS	54
PRIEDAI	63

SANTRUMPOS

APS – amonio persulfatas;
BSA – jaučio serumo albuminas (angl. bovine serum albumin);
CCF – krūtinės ertmės skystis (angl. chest cavity fluid);
CMV – citomegalo virusas;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
EBV – epšteino-baro virusas;
ENANBH – enterinis „ne A ir ne B“ hepatitas (angl. enteric non-A non-B hepatitis);
FBS – fetalinis veršiuko serumas (angl. fetal bovine serum);
HAV – hepatito A virusas;
HBV – hepatito B virusas;
Hel – RNR helikazė;
HEV – hepatito E virusas;
HRP – krienų peroksidazė (angl. horseradish peroxidase);
HVR – hipervariabilus regionas;
IB – imunoblotingas;
ICTV – Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas (angl. International Committee on Taxonomy of Viruses);
IFA – imunofermentinė analizė (angl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA);
IgG – imunoglobulinas G;
IgM – imunoglobulinas M;
IHC – imunohistochemija;
IP – imunoprecipitacija;
m7-GTP – 7-metilguanozino trifosfatas;
MAk – monokloniniai antikūnai;
MT – metiltransferazė;
MVB – multivezikulinis kūnelis;
NA – neuralginė amiotrofija;
ORF – atviro skaitymo rėmelis (angl. open reading frame);
OT – optinis tankis;
PAk – polikloniniai antikūnai;
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;

PBS-T – PBS su 0,1 % Tween-20;

PCP – į papainą panaši cisteino proteazė;

PI – pasikliautinis intervalas;

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija (angl. World Health Organization, WHO);

PVDF – polivinildifluoridas;

RdRp – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė;

SDS – natrio dodecilsulfatas;

SDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

TEMED – tetrametiletandiaminas;

TMB – tetrametilbenzidinas;

VPD – į virusą panašios dalelės;

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas.

IVADAS

Hepatitis E virusas (HEV) yra viengrandinės, teigiamos orientacijos RNR virusas, priklausantis *Hepeviridae* virusų šeimai. Dažniausiai HEV infekcija yra besimptomė arba pasireiškia ūmiu hepatitisu E. Rečiau, pacientams su silpna ar nuslopinta imunine sistema HEV infekcija gali sukelti lėtinį hepatitą E. Ūmaus hepatito E metu pacientai įprastai patiria panašius simptomus, kurie pasireiškia peršalimo metu – karščiavimas, nuovargis. Rizikos grupėje esantiems pacientams, turintiems lėtinių kepenų ligų, vyresnio amžiaus žmonėms ir nėščioms moterims gali pasireikšti tiesioginės hepatito E komplikacijos, tokios kaip staigus kepenų nepakankamumas. Taip pat šiems pacientams gali pasireikšti netiesioginės hepatito E komplikacijos kaip ūmus pankreatitas, inkstų nepakankamumas ir neurologiniai sindromai.

Didžioji dalis HEV kamienų priklauso *Paslahepevirus balayani* rūšiai, kuriai priskiriami aštuonių genotipų virusai (HEV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8). Penki šios rūšies genotipai (HEV-1, -2, -3, -4, -7) gali infekuoti žmones. HEV-3 ir HEV-4 yra pagrindiniai zoonotiniai virusai sukeliantys hepatitą E išsivysčiusiose šalyse. Anksčiau manyta, kad *Rocahepevirus rattii* rūšiai priskirtas žiurkių HEV (rat HEV; HEV-C1) negali infekuoti žmonių, tačiau neseniai buvo nustatyti HEV-C1 infekcijos žmonėse atvejai Hong Konge, Afrikoje ir Ispanijoje. HEV-C1 infekcija dažniausiai sukėlė sunkų ūmų hepatitą E, kurio metu pasireiškė gelta, pykinimas ir vėmimas, pilvo skausmai, tamsesnis šlapimas ir šviesesnės spalvos išmatos. Be to, viename iš trijų Ispanijoje aprašytų žiurkių HEV infekcijos atvejų pacientas mirė nuo kepenų ir inkstų nepakankamumo. Žiurkės, kurios dažnai kontaktuoja su žmonėmis bei naminiais gyvūnais, tapo natūraliu HEV rezervuaru, todėl atsiranda poreikis kurti naujus zoonotinių HEV nustatymo metodus virusų paplitimo tyrimams.

HEV epidemiologiniams tyrimams naudojami serologiniai testai nustato antikūnus prieš HEV. Kai kurie gamintojai taip pat siūlo komercinius testus HEV antigeno nustatymui. Komerciniuose testuose dažniausiai naudojamas imunocheminis metodas yra imunofermentinė analizė, kuria yra nustatomi HEV specifiški antikūnai. Šie testai neparodo, kurios rūšies virusas sukėlė infekciją, todėl šiame darbe buvo kuriamas serologinis metodas žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymui. Taip pat šiame darbe buvo kuriamas imunoprecipitacijos metodas HEV antigeno nustatymui laukinių gyvūnų kepenų mėginiuose.

Darbo tikslas:

Sukurti imunocheminius metodus zoonotinių HEV nustatymui žmonių ir laukinių gyvūnų mėginiuose.

Uždaviniai:

1. Išgryninti monokloninius antikūnus prieš HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus.

2. Sukurti imunoprecipitacijos metodą HEV kapsidės baltymų nustatymui laukinių gyvūnų kepenų mėginiuose.
3. Sukurti serologinį metodą žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymui ir ištirti žmonių ir žiurkių kraujo mėginius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 HEV klasifikacija

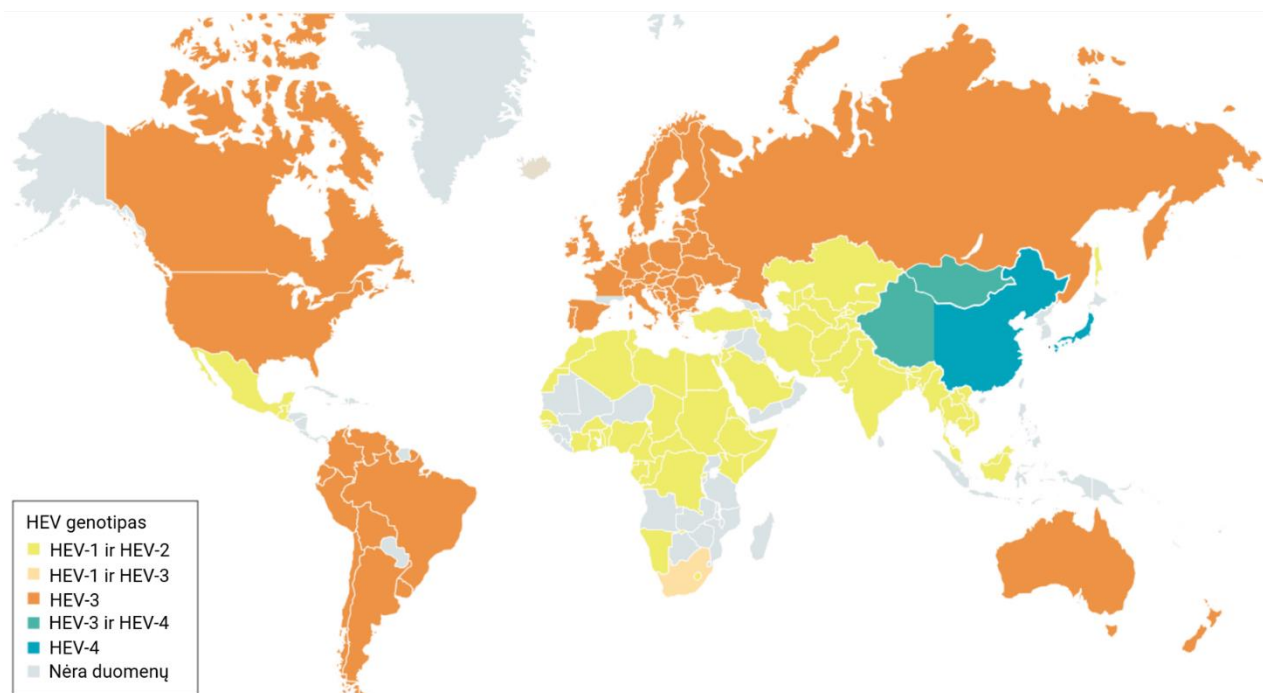
Hepatito E virusas (HEV) yra viengrandinės teigiamos orientacijos RNR virusas (Siddell et al., 2023). Remiantis paskutine 2022 m. paskelbta Tarptautinio virusų taksonomijos komiteto (angl. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) klasifikacija, HEV yra priskiriamas *Hepeviridae* šeimai, kuri skirstoma į du pošeimius: *Orthohepevirinae* ir *Parahepevirinae*. *Orthohepevirinae* pošeimiui priskiriamos keturios gentys: *Avihepevirus*, *Chirohepevirus*, *Paslahepevirus* ir *Rocahepevirus* (Purdy et al., 2022). *Parahepevirinae* pošeimiui priklauso viena rūšis *Piscihepevirus heenan* (angl. cut-throat trout virus), kuri infekuoja lašišinių šeimos žuvis (Batts et al., 2011). *Avihepevirus magniiecur* rūšis (paukščių HEV) buvo aptikta tik paukščiuose ir yra skirstoma į keturis genotipus: 1 genotipas (HEV-B1) aptiktas tik Australijoje (Payne et al., 1999); HEV-B2 ir HEV-B3 aptikti Azijoje (X. Zhang et al., 2017), Europoje (Bilic et al., 2009) ir JAV (Haqshenas et al., 2001), o HEV-B4 nustatytas Azijoje (X. Zhang et al., 2017) ir Vengrijoje (Bányai et al., 2012). *Chirohepevirus* gentis (šikšnosparnių HEV) buvo aptikta tik šikšnosparniuose, o duomenų apie šio viruso zoonotinį potencialą nėra (Drexler et al., 2012).

Paslahepevirus gentis turi platų šeimininkų spektrą (žmonės, naminiai ir laukiniai žinduoliai) (Smith et al., 2020). *Paslahepevirus balayani* rūšiai priskiriami aštuoni genotipai. HEV-1 ir HEV-2 infekuoja tik žmones ir dažniausiai paveikia besivystančias šalis, kuriose virusas plinta per išmatomis užterštą geriamąjį vandenį. HEV-3 ir HEV-4 šeimininkai yra žmonės, delfinai, galvijai, elniai, ožkos, kiaulės, šernai, avys, triušiai ir kt. (Di Martino et al., 2016; Izopet et al., 2012; Smith et al., 2020; Takahashi et al., 2014; Villalba et al., 2017; Wu et al., 2015), HEV-5 ir HEV-6 aptiktas šernuose (Takahashi et al., 2014), HEV-7 – kupranugariuose ir žmonėse (Lee et al., 2016a), HEV-8 – kupranugariuose (Woo et al., 2014). *Rocahepevirus* gentis buvo aptikta graužikuose (žiurkėse, šeškuose, pelėnuose) (Purdy et al., 2022). *Rocahepevirus ratt*i rūšies genotipas HEV-C1 nustatytas eulipotiflidų (muskusinė kumutė, lot. *Suncus murinus*), žmonių ir graužikų tarpe (Sridhar et al., 2018a). *Rocahepevirus ratt*i rūšies genotipas HEV-C2 aptiktas kiauninių šeimai prisklausančiuose šeškuose ir audinėse (Raj et al., 2012).

1.2 HEV istorija ir epidemiologija

1970-ųjų pabaigoje Indijoje, Kašmyro slėnyje per 200 kaimų išplito didelio masto, vandeniu plintanti hepatito epidemija, sukėlus 52 000 gelta pasireiškiančios ligos atvejų ir 1700 mirčių (Khuroo et al., 2016). Nors pacientų klinikiniai simptomai buvo panašūs į hepatito A, jie buvo serologiškai

neigiami tiek hepatito A virusui (HAV), tiek hepatito B virusui (HBV). Šis atradimas paskatino pasiūlyti naujo „ne A ir ne B“ hepatito viruso egzistavimą (angl. enteric non-A non-B hepatitis, ENANBH) (Wong et al., 1980). 1983 m. panašūs simptomai buvo pastebėti protrūkio metu Sovietų sąjungos karinėje stovykloje Afganistane. Savanoris išgėrė devynių sergančių pacientų išmatų ekstraktų mišinį ir jam pasireiškė ūmiam hepatitui būdingi požymiai ir simptomai. Paciento išmatose buvo aptiktos 27-30 nm dydžio sferinės į virusus panašios dalelės (angl. virus-like particles, VLP), kurios, suleidus jas ilgauodegėms makakoms, sukėlė hepatitą (Balayan et al., 2008). Tai parodė, kad virusas gali būti perduodamas fekaliniu-oraliniu keliu. Dalis ENANBH komplementarios DNR (cDNR) buvo pirmą kartą sekvenuota 1990 m., o tais pačiais metais ENANBH buvo pervadintas į „hepatito E virusą“ (Reyes et al., 1990). HEV dabar yra pripažįstamas pasauline sveikatos problema tiek besivystančiuose, tiek išsivysčiusiuose regionuose, įskaitant Pietų ir Rytų Aziją, Rytų Afriką, Meksiką, Vakarų Europą ir JAV (Rein et al., 2012) (1 pav.).



1 pav. Skirtinguose pasaulio regionuose dominuojantys HEV genotipai (modifikuota pagal Kamar et al., 2017).

Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO, angl. World Health Organization, WHO) duomenimis vertinama, kad kasmet apie 20 milijonų žmonių susiduria su HEV infekcija, iš jų 3,3 milijono simptominių ligos atvejų ir 60 tūkstančių mirčių. HEV infekcija sukelia net 50 % ūmaus hepatito atvejų Indijoje ir sukėlė 17 didelio masto epidemijų Afrikoje tarp 1988 ir 2013 m. (Guthmann et al., 2006; McCarthy et al., 1994; Thomson et al., 2013). Nors dideli HEV protrūkiai būdingi tik besivystančioms

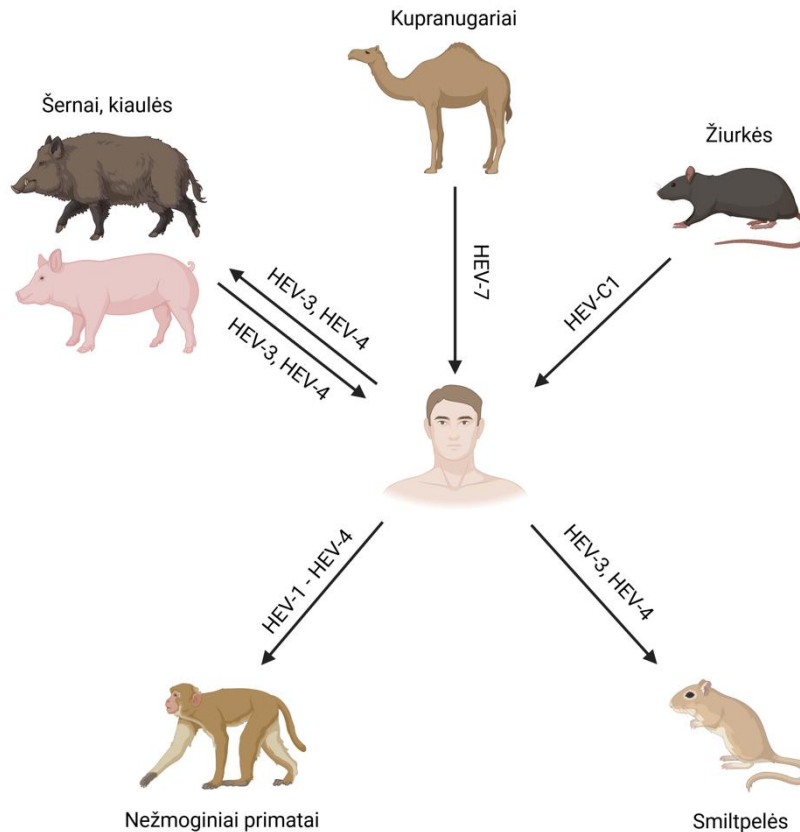
šalims, vis daugiau lokaliai paplitusios infekcijos atvejų nustatoma išsivysčiusiose šalyse, kur įprastai nustatomos HEV-3 ir HEV-4 infekcijos (Clemente-Casares et al., 2016) (1 pav.). HEV-3 ir HEV-4 perdavimo keliai yra zoonotiniai, pavyzdžiui, vartojant netinkamai termiškai apdorotą kiaulieną ar šernieną, taip pat per kraujo perpylimus ar organų transplantacijas iš HEV infekuotų donorų (Clemente-Casares et al., 2016). Antikūnų prieš HEV paplitimas JAV siekia 6 %, o daugelyje Europos šalių paplitimas yra dar didesnis: pavyzdžiui, pietų Prancūzijoje tarp kraujo donorų vidutinis antikūnų prieš HEV paplitimas sudaro 39,1 %, tačiau priklausomai nuo geografinės vietovės svyruoja nuo 21,9 iki 71,3 % (Ditah et al., 2014; Miyamura, 2011). Antikūnų prieš HEV paplitimo tyrimai buvo atliekami ir Lietuvoje. Iš 366 žmonių kraujo mėginių IgG antikūnai prieš HEV buvo nustatyti 9,6 % mėginių (PI 95 % 6,6-12,6), o IgM antikūnai prieš HEV buvo nustatyti 4,1 % mėginių (PI 95 % 2,1- 6,1) (Grigas et al., 2021). Nors dėl mažos mėginių imties negalime priimti konkrečių išvadų apie HEV paplitimą Lietuvos žmonių populiacijoje, šie duomenys parodo, kad Lietuvoje, kaip ir kitose išsivysčiusiose šalyse, HEV cirkuliuoja žmonių populiacijoje.

1.3 HEV zoonozės

Zoonotinis HEV pirmą kartą buvo aptiktas 1997 metais Jungtinėse Amerikos Valstijose naminėse kiaulėse ir pavadintas kiaulių hepatito E virusu (kiaulių HEV) (Meng et al., 1997). Didžioji dalis dokumentuotų zoonotinio HEV infekcijos atvejų žmonėse yra susiję su HEV-3 ir HEV-4 genotipų virusais, priklausančiais *Paslahepevirus balayani* rūšiai (Meng, 2013). Šių dviejų genotipų HEV pagrindiniai rezervuarai yra naminės kiaulės, šernai ir elniai. Pavyzdžiui, HEV-3 RNR buvo aptikta maždaug 6 % skerdyklose JAV tirtų kiaulių kraujo mėginių, o tai kelia susirūpinimą dėl galimos HEV kontaminacijos kiaulienos tiekimo grandinėje (Sooryanarain et al., 2020). HEV-3 ir HEV-4 infekcijos atvejai, susiję su žalios ar nepakankamai termiškai apdorotos kiaulienos vartojimu, yra gerai dokumentuoti visame pasaulyje (Dalton & Izopet, 2018). Be to, šių genotipų zoonotinės infekcijos gali būti sukeltos per tiesioginį kontaktą su užkrėstais gyvūnais, vandens šaltinių ir žemės ūkio produktų užteršimą užkrėstų gyvūnų išmatomis, kurios naudojamos kaip trąšos, bei retkarčiais per organų transplantaciją ar kraujo perpylimą (Sooryanarain & Meng, 2019). HEV-3 ir HEV-4 sukelia lėtinės infekcijas asmenims su nusilpusia ar nuslopinta imunine sistema, pavyzdžiui, organų transplantacijos recipientams (Dalton et al., 2018). Taip pat HEV-3 ir HEV-4 infekcija gali sukelti inkstų ir neurologinius pažeidimus, pankreatitą ir hematologinius sutrikimus (Dalton et al., 2018).

Kiaules ir šernus užkrečiantys HEV-3 ir HEV-4 yra pagrindiniai zoonotinių HEV infekcijų šaltiniai žmonėms, tačiau HEV iš kitų gyvūnų, tokių kaip elniai, triušiai, kupranugariai ir žiurkės, taip pat gali užkrėsti žmones (2 pav.). 2003 m. HEV-3 protrūkiai Azijoje ir Europoje buvo tiesiogiai siejami su žalios

elnienos vartojimu (Tei et al., 2003), o 2015-2016 m. Prancūzijoje buvo užfiksuota daugybė triušių HEV-3 infekcijos atvejų žmonėse (Abravanel et al., 2017). 2016 m. Jungtiniuose Arabų Emiratuose kupranugarių mėsos ir pieno vartojimas sukėlė lėtinę HEV-7 infekciją pacientui su kepenų transplantatu



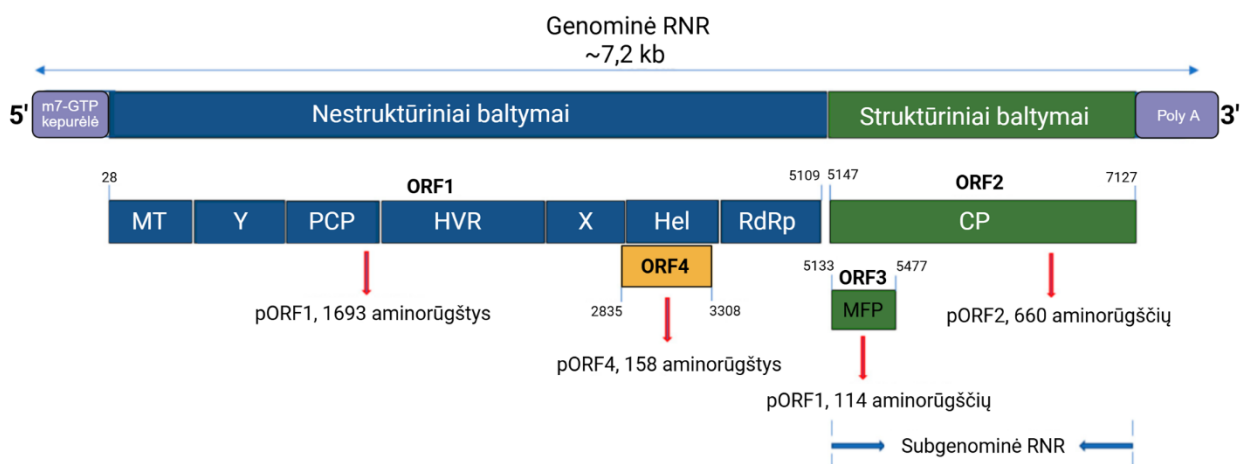
2 pav. Skirtingų HEV genotipų perdavimas tarp žmogaus ir kitų gyvūnų. Sukurta naudojant Biorender.com

(Lee et al., 2016). Be *Paslahepevirus balayani* rūšies, pasaulyje vis daugėja nustatytų *Rocahepevirus ratt*i rūšies (žiurkių HEV/HEV-C1) infekcijos atvejų. 2018 m. žiurkių HEV sukėlė lėtinį hepatitą pacientui su kepenų transplantatu Honkonge (Sridhar et al., 2018b), o 2019 m. Kanadoje buvo aprašytas žiurkių HEV infekcijos atvejis, kuris sukėlė sunkų ūmų hepatitą E sveikam asmeniui (Andonov et al., 2019). 2021 m. Honkonge žiurkių HEV infekcija buvo nustatyta dar 8 asmenims, iš kurių 7 buvo vyrai (Sridhar et al., 2021). 2022 m. Ispanijoje nustatyti 3 žiurkių HEV infekcijos atvejai (Rivero-Juarez et al., 2022). Du pacientai patyrė lengvus ūmaus hepatito E simptomus ir pasveiko savaime, tačiau trečias pacientas buvo pristatytas į ligoninę ir po 9 dienų mirė dėl kepenų ir inkstų nepakankamumo (Rivero-Juarez et al., 2022). Lyginant su HEV-3 ir HEV-4, žiurkių HEV taip pat sukėlė lėtines infekcijas asmenims su nuslopinta imunine sistema bei dažniau lėmė sunkius ūmaus hepatito E simptomus

(Andonov et al., 2019; Reuter et al., 2020) ir net mirtį nuo inkstų ir kepenų nepakankamumo (Rivero-Juarez et al., 2022). Dėl šių priežasčių reikalingi tolesni žiurkių HEV tyrimai bei efektyvūs viruso nustatymo metodai, kurie padės atlikti epidemiologinius tyrimus bei rizikos visuomenės sveikatai vertinimą.

1.4 HEV genomo struktūra ir replikacija

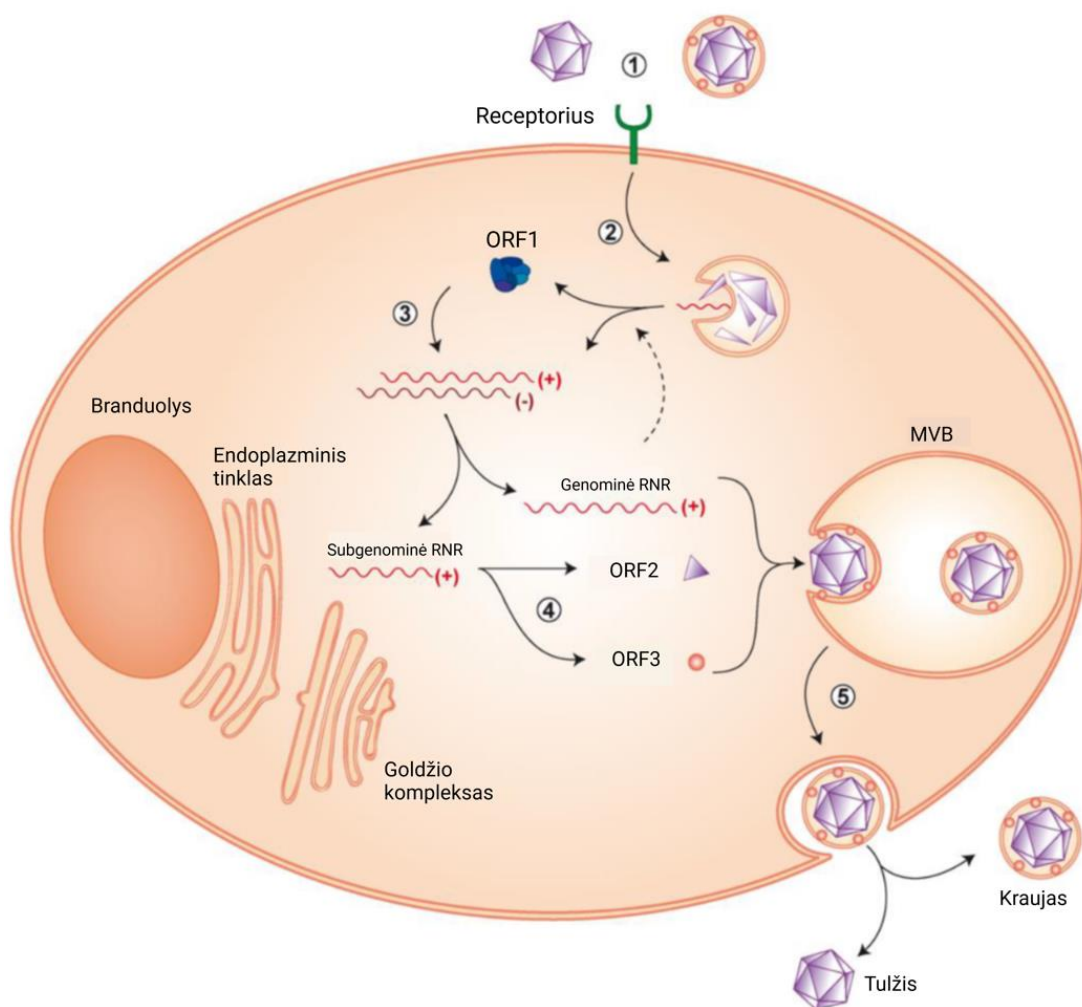
HEV yra lipidinio apvalkalėlio neturintis virusas, pasižymintis ikosaedrine kapsidės simetrija bei maždaug 27-34 nm dydžio virionais (Graff et al., 2006). Nors išmatose nustatomi HEV virionai neturi apvalkalėlio, kraujyje ir ląstelių kultūrų supernatante cirkuliuojančius virionus dengia šeimininko ląstelės kilmės membraninis apvalkalėlis (Nagashima et al., 2017). Membraniniu apvalkalėliu padengti HEV virionai yra mažiau infektyvūs, tačiau yra atsparūs neutralizuojantiems antikūnams (Nagashima et al., 2017). HEV genomas yra teigiamos orientacijos ~7,2 kb ilgio viengrandinė RNR (Graff et al., 2006). HEV RNR turi 7-metilguanozino trifosfato kepurę (m7-GTP) 5' gale ir poli(A) uodegą 3' gale (3 pav.). Tarp šių dviejų nekoduojančių sričių yra trys dalinai persidengiantys atviro skaitymo rėmeliai (angl. open reading frame, ORF), kartu su neseniai atrastu ORF4 (Yadav et al., 2021) (3 pav.). Be to, HEV infekuotose ląstelėse yra produkuojama 2,2 kb ilgio subgenominė RNR, nuo kurios yra transliuojami



3 pav. HEV-1 genomas (modifikuota pagal Yadav et al., 2021b). MT – metiltransferazė, Y – nežinomos funkcijos domenai, PCP – į papainą panaši cisteino proteazė, HVR – hipervariabilus regionas, X – nežinomos funkcijos domenai, Hel – RNR helikazė, RdRp – nuo RNR priklausanti RNR polimerazė, CP – kapsidės baltymas, ORF1-ORF4 – atviro skaitymo rėmeliai, pORF1-pORF4 – atviro skaitymo rėmelių koduojami baltymai.

ORF2 ir ORF3 (Graff et al., 2006). ORF1 koduoja nestruktūrinius baltymus, turinčius fermentinį aktyvumą: metiltransferazė (MT), X ir Y domenai, į papainą panaši cisteino proteazė (PCP),

hipervariabilus regionas (HVR), RNR helikazė (Hel), nuo RNR priklausanti RNR polimerazė (RdRp) (3 pav.). Met kartu su guaniltransferaze ir guanino-7-metiltransferaze formuoja m⁷-GTP kepurėlę, kuri yra būtina HEV infektyvumui (Hooda et al., 2022). Potenciali PCP funkcija yra ląstelės antivirusinio imuninio atsako slopinimas (Karpe & Lole, 2011). Hel 5'→3' kryptimi išardo RNR antrines struktūras, kas leidžia RdRp efektyviai atlikti RNR sintezę (Karpe & Lole, 2010). Kitų ORF1 koduojamų baltymų funkcijos nėra tiksliai žinomos. ORF2 koduoja HEV kapsidės baltymą (Zhou et al., 2021). Dalinai su ORF2 persidengiantis ORF3 koduoja fosforilintą multifunkcinį baltymą, kuris tarnauja kaip jonų kanalas ir dalyvauja viriono morfogenezeje bei išėjime iš ląstelės (Ding et al., 2017). HEV-1 genotipo viruse neseniai buvo nustatytas dar vienas atviro skaitymo rėmelis, pavadintas ORF4 (Yadav et al., 2021) (3 pav.). ORF4 koduojami baltymai dalyvauja viruso replikacijoje palaikydami normalią RdRp funkciją (Yadav et al., 2021).



4 pav. HEV replikacijos ciklas ląstelėje (modifikuota pagal Oechslin et al., 2022). ORF1-ORF3 – atviro skaitymo rėmeliai, MVB – multivezikulinis kūnelis.

Pagrindinė HEV replikacijos vieta yra kepenų ląstelės hepatocitai, tačiau HEV taip pat gali replikuotis kitose ląstelėse ir audiniuose, pavyzdžiui, monocituose, blužnyje, limfiniuose mazguose ir plonosios žarnos epitelio ląstelėse (Sayed et al., 2020). Įprastai virusas plinta fekaliniu-oraliniu būdu ir pasiekia hepatocitus per kraują. HEV prisijungimui prie ląstelės būtinas receptorių kolkas nėra nustatytas, tačiau žinoma, kad apvalkalėlio neturinčiam virionui prisijungti prie ląstelės būtinas heparano sulfato proteoglikanas, tuo tarpu šeimininko kilmės membraninį apvalkalėlį turintiems virionams papildomos molekulės prisitvirtinimui prie ląstelės nėra reikalingos (Kalia et al., 2009). Tikslus HEV patekimo į ląstelę būdas nėra žinomas. Manoma, kad virionai į ląstelę patenka vykstant nuo dinamino-2 ir klatrino priklausomai endocitozei (Holla et al., 2015). Ląstelėje vyksta virionų išrengimas (angl. uncoating), ko pasekoje koduojanti RNR tarnauja matrica ORF1 transliacijai (Panda et al., 2000) (4 pav., 2 etapas). HEV-1 atveju kartu su ORF1 yra transliuojamas ORF4 (3 pav.). ORF4 koduojami baltymai skatina viruso replikacijos komplekso susidarymą bei palaiko RdRp aktyvumą (Yadav et al., 2021). Transkripcija prasideda kuomet ORF1 transliacijos metu susintetinta RdRp jungiasi prie genominės RNR 3' galo ir susintetina neigiamos orientacijos RNR (4 pav. 3 etapas). Ji tarnauja matrica teigiamos orientacijos genominės RNR sintezei, bei subgenominės RNR sintezei, kuri yra transliuojama į ORF2 ir ORF3 koduojamus baltymus (Oechslin et al., 2022) (4 pav. 4 etapas). Tiek neigiamos, tiek teigiamos orientacijos RNR sintezę vykdo ta pati ORF1 koduojama RdRp. Po subgenominės RNR transliacijos susintetintas ORF2 baltymas supakuoja teigiamos orientacijos genomine RNR į naujus virionus. ORF3 baltymas jungiasi prie viriono kapsidės paviršiaus bei prisijungia prie ląstelės membranos lipidų, kas lemia viriono apsigaubimą šeimininko kilmės membraniniu apvalkalėliu ir išėjimą iš ląstelės (Ding et al., 2017) (4 pav., 5 etapas). Infektyvūs HEV virionai patenka į kraują arba į tulžį. Manoma, kad virionų lipidinį apvalkalėlį suardo tulžies rūgštys ir/arba kasos sekretuojami fermentai, todėl išmatose detektuojami virionai yra neapgauti (Oechslin et al., 2020). Nors hepatocitai yra pagrindinės ląstelės, kuriose vyksta HEV replikacija, *in vitro* rezultatai rodo, kad HEV gali infekuoti ir replikuotis ne tik kepenų ląstelėse, pavyzdžiui, A549 plaučių karcinomos ląstelėse ir Caco-2 storosios žarnos karcinomos ląstelėse (Holla et al., 2015). Eksperimentiškai HEV-3 infekuotose kiaulėse buvo nustatyta HEV RNR kepenų, plonosios žarnos, limfmazgių ir storosios žarnos ląstelėse (Williams et al., 2001). HEV gebėjimas infekuoti skirtingus ląstelių tipus plečia klinikinių pasekmių spektrą bei kelia naujus iššūkius diagnostikai, gydymui ir profilaktikai.

1.5 Hepatito E klinikiniai simptomai

Didžioji dalis hepatito E atvejų yra besimptomiai, o pacientai pasveiksta savaime praėjus kelioms savaitėms. Ūmaus hepatito E forma išsivysto 5–30 % infekuotų pacientų, kurie įprastai patiria ligos

simptomus, tokius kaip karščiavimas, pykinimas ir vėmimas, apetito stoka (Wedemeyer et al., 2012). Neretai pasireiškia specifiniai hepatito E simptomai, tokie kaip gelta, tamsios spalvos šlapimas ir šviesesnės spalvos išmatos. Įprastai ligos simptomai praeina savaime po kelių dienų ar savaitės, tačiau hepatito E epidemijų metu mirtingumas gali svyruoti nuo 0,5 % iki 4,0 % ligos atvejų (Wedemeyer et al., 2012). HEV-1 ir HEV-2 daugiausiai infekuoja jaunos vyrus (15-30 metų) besivystančiose šalyse. Šių dviejų genotipų HEV infekcija gali būti kiek besimptomė, tiek sukelti lengvus arba sunkius ūmaus hepatito E simptomus (Wedemeyer et al., 2012). HEV-1 ir HEV-2 yra ypač pavojingi nėščiosioms, esančioms antrame ar trečiame nėštumo trimestre (Navaneethan et al., 2008). Infekuotos nėščiosios susiduria su aukštesne ūmaus kepenų nepakankamumo rizika, o mirtingumas trečiąjį trimestrą gali siekti net 25 % (Navaneethan et al., 2008). HEV-1 ar HEV-2 infekuotos nėščiosios miršta nuo gimdymo metu patiriamų komplikacijų, tokių kaip kraujavimas ar eklampsija (Khuroo et al., 2009). Taip pat infekuotoms nėščiosioms dažnai nustatomi negyvi gimdymai bei vertikalūs HEV perdavimas naujagimiams, dėl kurio padidėja naujagimių sergamumas ir mirtingumas (Khuroo et al., 2009). HEV-1 infekcija nėštumo metu taip pat siejama su dažnesniais persileidimais ir priešlaikiniais gimdymais (Navaneethan et al., 2008). Naujagimiai susiduria su didesne neonatalinių komplikacijų rizika, tokių kaip ūmus kepenų nepakankamumas, pernelyg mažas kūno svoris ir/ar dydis ar net mirtis neonataliniu laikotarpiu (Aggarwal & Goel, 2021).

Išsivysčiusios šalyse dažniausiai yra nustatomos HEV-3 infekcijos (1 pav.). Pacientams segantiems gretutinėmis kepenų ligomis ženkliai išauga ūmaus kepenų nepakankamumo rizika tiek besivystančiose, tiek išsivysčiusiose šalyse (J. M. Péron et al., 2007). Europoje nuo 5 % iki 33 % HEV-3 ar HEV-4 infekuotų pacientų išsivysto simptomai, įskaitant geltą (Faber et al., 2018). Pacientams su silpna ar nuslopinta imunine sistema, įskaitant pacientus su organų transplantatais ir ŽIV koinfekuotus asmenis, HEV-3, HEV-4 ar žiurkių HEV (HEV-C1) infekcija gali tapti lėtine (Gérolami et al., 2008a; Kenfak-Foguena et al., 2011; Rivero-Juarez et al., 2019). Šiems pacientams žiurkių HEV infekcija gali būti labiau pavojinga negu HEV-3 ar HEV-4 infekcija, kadangi HEV-C1 dažniau sukelia sunkius ūmaus hepatito E simptomus (Andonov et al., 2019; Reuter et al., 2020), kurie gali sukelti įvairias komplikacijas (Sridhar et al., 2022). Taip pat yra aprašyti lėtinės HEV infekcijos atvejai pacientams, sergantiems hematologinėmis ligomis (J.-M. Péron et al., 2006; Tamura et al., 2007), kamieninių ląstelių transplantacijos recipientams (Versluis et al., 2013) bei pacientams, kuriems taikoma chemoterapija (Geng et al., 2014; Ollier et al., 2009) ar intensyvi imunoterapija (Bauer et al., 2015). Lėtinė HEV infekcija yra nustatoma, kuomet HEV replikacija paciento ląstelėse vyksta daugiau nei tris mėnesius (Kamar et al., 2013). Lėtinė HEV infekcija sukelia lėtinį hepatitą E, o 10 % pacientų greitai išsivysto

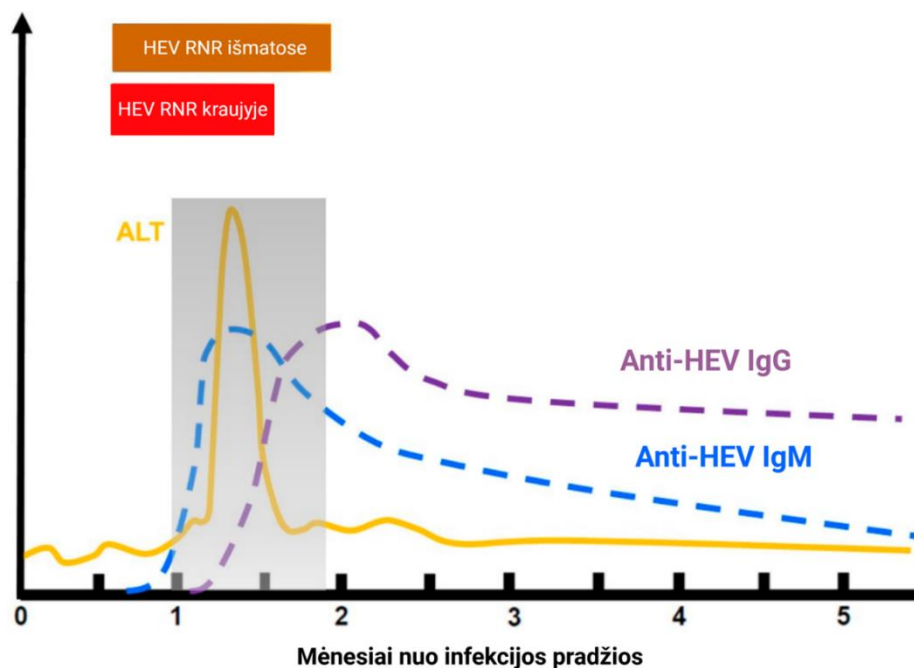
kepenų cirozė (Gérolami et al., 2008b; Haagsma et al., 2008). Dalis pacientų su lėtinės HEV infekcijos sukelta kepenų ciroze miršta per 2-3 metus (Haagsma et al., 2008).

Tiek ūmaus, tiek lėtinio hepatito E atveju pacientams gali pasireikšti ekstrahepatinės komplikacijos. Neurologiniai sutrikimai yra dažnai nustatomi HEV infekuotiems pacientams. Iki 2016 metų išsivysčiusiose šalyse neurologiniai sutrikimai buvo nustatyti apie 100 HEV infekuotų pacientų (Dalton et al., 2016). Įprastai nustatomi neurologiniai sutrikimai yra neuralginė amiotrofija (NA), Guillan-Baré sindromas, Bello paralyžius ir poliradikulopatija (Dalton et al., 2017; Iza et al., 2025; Jha et al., 2021). Prancūzijoje, Jungtinėje Karalystėje ir Nyderlanduose bendrai buvo ištirta daugiau nei 450 pacientų su ūmiais neurologiniais sutrikimais (Dalton et al., 2017). Tyrimas parodė, kad 2,4 % pacientų buvo susidūrę su HEV infekcija, o visi trys NA atvejai buvo susiję su HEV (Dalton et al., 2017). HEV infekcijos ir Guillan-Baré sindromo sąsaja yra pagrįsta trimis tyrimais iš Bangladešo (Geurtsvankessel et al., 2013), Japonijos (Fukae et al., 2016) ir Nyderlandų (van den Berg et al., 2014). Šiuose tyrimuose nustatyta, kad 5-11 % Guillan-Baré sindromo pacientų buvo neseniai susidūrę su HEV infekcija. HEV infekuotuose pacientuose taip pat buvo nustatytos ir kitos neurologinės komplikacijos tokios kaip neuropatinis skausmas, encefalitas, mielitas, ausies neuritas ir periferinė neuropatija (Abravanel et al., 2018; Dalton et al., 2016). Mechanizmai, kuriais HEV sukelia neurologinius sutrikimus, nėra žinomi, tačiau tam tikrą vaidmenį gali turėti paciento imuninis atsakas į virusą. Prancūzijoje atliktas tyrimas parodė, kad Guillan-Baré sindromas ir NA buvo dažnesni pacientuose su sveika imunine sistema (22,6 %) negu pacientuose su nusilpusia imunine sistema (3,2 %, $p < 0,001$) (Abravanel et al., 2018). Be neurologinių sutrikimų tiek ūmus, tiek lėtinis hepatitas E gali lemti inkstų pažeidimus (Kamar et al., 2005), pankreatitą (Deniel et al., 2011) ar hematologinius sutrikimus, tokius kaip anemija (Thapa et al., 2009; Zamvar et al., 2005).

1.6 Imunocheminiai HEV nustatymo metodai

HEV yra pasaulinė sveikatos problema ir, anot PSO, apie trečdalis žmonių populiacijos tam tikru gyvenimo metu susiduria su HEV infekcija. Tikslus ir savalaikis HEV infekcijos nustatymas yra itin svarbus ne tik paciento priežiūrai, bet ir epidemiologinei stebėsenai bei protrūkių valdymui. Dėl savo aukšto specifiškumo HEV infekcijos nustatymo auksinis standartas yra polimerazinė grandininė reakcija (PGR, angl. polymerase chain reaction, PCR) (Iqbal et al., 2023). PGR metodais yra nustatoma HEV RNR, kurią paciento kraujyje ar išmatose galima detektuoti dar viruso inkubacijos laikotarpiu (Kraef et al., 2018) (5 pav.). Tai leidžia nustatyti HEV infekciją dar iki kol kraujyje gali būti detektuojami antikūnai prieš HEV. Taip pat PGR metodais gali būti nustatomas virusinės RNR kiekis kraujyje, todėl šie metodai leidžia atlikti tiek kokybinę, tiek kiekybinę analizę (Salvio et al., 2018). Nors PGR metodai savo jautrumu

ir specifiškumu yra pranašesni už kitus HEV nustatymo metodus, jie reikalauja brangios specializuotos įrangos, kuri nevisur yra prieinama. Be to, PGR metodu negalima nustatyti buvusios infekcijos, kadangi viruso RNR aptinkama kraujyje ir išmatose tik infekcijos metu (Kamar et al., 2017a). Alternatyva molekuliniams metodams tarnauja imunocheminiai metodai, tokie kaip imunofermentinė analizė (IFA), imunoprecipitacija (IP) ir imunohistochemija (IHC). HEV nustatymui naudojamų imunocheminių metodų taikiniai yra viruso antigenas – ORF2 koduojamas kapsidės baltymas – arba šeimininko humoralinis imuninis atsakas – antikūnai. Tiek HEV kapsidės baltymo, tiek antikūnų prieš HEV nustatymui dažniausiai yra naudojami serologiniai testai. Pagrindiniai šių testų taikiniai yra IgG ir IgM klasių antikūnai bei kartais HEV kapsidės baltymas. IgM antikūnų kraujyje daugiausia ankstyvosiose infekcijos fazėse, o laikui bėgant jų kiekis vis mažėja (Zhao & Wang, 2016) (5 pav.). IgM antikūnų nustatymas serologiniais testais indikuoja, kad pacientas šiuo metu yra HEV infekuotas arba neseniai persirgo. Komerciniai IgM prieš HEV nustatymo rinkiniai nėra taikomi infekcijos diagnostikoje dėl savo mažo jautrumo (Norder et al., 2016a). IgG antikūnai susidaro vėliau ir cirkuliuoja kraujyje metais ar net visą gyvenimą (Zhao & Wang, 2016) (5 pav.). IgG antikūnų prieš HEV aptikimas rodo, kad pacientas praeityje buvo susidūręs su HEV infekcija, tačiau šiuo metu nebūtinai yra infekuotas. Taip pat IgG antikūnų aptikimas gali indikuoti lėtinę HEV infekciją (Horvatits et al., 2020). Ūmios infekcijos metu kraujyje ir kepenyse taip pat gali būti aptinkamas HEV antigenas, indikuojantis ne imuninį atsaką, o pačio virusą buvimą (Q. Zhang et al., 2020).



5 pav. HEV RNR ir antikūnų prieš HEV titras ūmios infekcijos žmoguje eigoje. Modifikuota pagal (Lhomme et al., 2020).

Komercinius IFA rinkinius antikūnų prieš HEV nustatymui siūlo skirtingi gamintojai, tokie kaip Wantai, Mikrogen, Lizhu, Kehua, Genelabs, Euroimmun, Axiom ir kiti (Abravanel et al., 2013; Norder et al., 2016b; Q. Zhang et al., 2020). Šių gamintojų testuose IgM ir/arba IgG antikūnų prieš HEV nustatymui dažniausiai yra taikoma netiesioginė IFA (Abravanel et al., 2013; Norder et al., 2016b; Q. Zhang et al., 2020). Netiesioginėje IFA naudojamas rekombinantinis HEV kapsidės baltymas arba sintetinis peptidas yra imobilizuojamas plokštelės šulinėlių dugne ir inkubuojamas su kraujo serumo mėginiu (Abravanel et al., 2013; Norder et al., 2016b; Q. Zhang et al., 2020). Imobilizuotas HEV antigenas išgaudo jam specifiskus antikūnus, o pridėjus antrinių antikūnų su fermentine ar fluorescentine žyme yra išmatuojamas atitinkamai spalvos pokytis arba fluorescencija. Skirtingų gamintojų serologiniai testai skiriasi savo jautrumu ir specifiskumu. Keturių gamintojų (Wantai, Kehua, Lizhu ir Genelabs) testų jautrumas ir specifiskumas buvo palygintas naudojant tuos pačius HEV infekuotų pacientų kraujo mėginius (Q. Zhang et al., 2020). Buvo nustatyta, kad IgM antikūnų testų jautrumas varijavo tarp 82,6 % ir 86 %, tuo tarpu specifiskumas yra labai aukštas – 97,8-100 % (Q. Zhang et al., 2020). IgG antikūnų testų jautrumas varijavo tarp 87,2 % ir 91,9 %, tuo tarpu Kehua (97,5 %) ir Genelabs (97,5 %) testų specifiskumas buvo aukštesnis negu Wantai (74,8 %) ir Lizhu (75,9 %) (Q. Zhang et al., 2020). 2013 metų tyrime buvo palyginti aštuoni komerciniai IgM/IgG rinkiniai testuojant HEV-3 infekuotų pacientų mėginius (Pas et al., 2013). Serijinio mėginio skiedimo eksperimentas parodė, kad Wantai IgG testas turi aukščiausią analitinį jautrumą, o aukščiausią specifiskumą pademonstravo Wantai IgM testas (> 99 %) (Pas et al., 2013).

Kai kurie gamintojai taip pat siūlo HEV antigeno nustatymo rinkinius. Wantai antigeno nustatymo testas remiasi dviepitope IFA (Q. Zhang et al., 2020). MAk specifiskas tam tikram HEV kapsidės baltymo epitopui yra imobilizuojamas plokštelės šulinėliuose, o pridėjus mėginio HEV kapsidės yra išgaudomas. Fermentine ar fluorescentine žyme žymėtas MAk specifiskas kitam HEV antigeno epitopui jungiasi prie HEV kapsidės baltymo, ko pasekoje matuojamas spalvos pokytis ar fluorescencija. Buvo pademonstruota, kad šiuo testu galima nustatyti HEV dar nesusidarius antikūnams anstyvoje infekcijos fazėje, tačiau 7 % atvejų, kuomet buvo nustatyta HEV RNR, antigenas nebuvo detektuotas (Q. Zhang et al., 2020). Tai rodo, kad HEV antigeno nustatymo testo nepakanka infekcijos diagnozavimui. Dar vienu imunofermentiniu metodu HEV antigeno nustatymui potencialiai galėtų tarnauti IP. IP metode MAk jungiasi prie magnetinių ar sefarozės dalelių ir inkubacijos su mėginiu metu yra išgaudomas HEV antigenas. Atlikus baltymo eliuciją mėginiai yra analizuojami natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforeze (angl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) ar imunoblotingu (IB). IP metodo taikymas HEV nustatymui kol kas nėra aprašytas.

Komercinių serologinių rinkinių palyginimai parodė variabilumą tarp skirtingų gamintojų testų (Pas et al., 2013; Q. Zhang et al., 2020). Skirtingi testai pasižymi skirtingu specifiškumu ir jautrumu net tada, kai yra testuojami tie patys mėginiai (Pas et al., 2013; Q. Zhang et al., 2020). Tai reiškia, kad priklausomai nuo naudojamo komercinio rinkinio gali pasitaikyti klaidingai teigiamų ar klaidingai neigiamų rezultatų. Kuomet serologiniai testai nėra pakankamai jautrūs, žemu antikūnų titru pasižyminčios besimptomės infekcijos gali būti nenustatytos, jei naudojami tik serologiniai testai (Q. Zhang et al., 2020). Kitas šių testų, ypač IgM nustatymo testų, trūkumas yra kryžmiškas specifiškumas kitoms infekcijoms, pavyzdžiui citomegalo viruso (CMV) ar epšteino-baro viruso (EBV) infekcijoms (Hyams et al., 2014). Be to, visi komerciniai rinkiniai nustato antikūnus prieš HEV, tačiau jie negali nustatyti, kurios rūšies virusas sukėlė infekciją. Skirtingų HEV rūšių infekcijų poveikis pacientams gali būti įvairus, todėl testas detektuojantis antikūnus specifiškus tam tikrai HEV rūšiai būtų naudingas HEV epidemiologiniams tyrimams.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Ląstelių linijos

Hibridomų ląstelių linijos CPB11, CPE9, 5F3, CPC9, CPH7, CPF6, 5G5, 2B2, 2C9, 9C8, CPD9, CPE4 (Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras Biotechnologijos institutas Imunologijos skyrius (VU GMC BTI ILS), dr. Martynas Simanavičius ir dr. Indrė Kučinskaitė-Kodzė).

IP eksperimentams buvo naudojamas HEK293 ląstelių (VU GMC BTI ILS kolekcija) lizatas.

2.1.2 Reagentai

(NH₄)₂SO₄ (Roth);

„Assay Defender“ tirpalas (Candor Bioscience GmbH);

„Sephadex G-25“ kolonėlė „PD-10“ (Cytiva);

40 % akrilamido tirpalas „ROTIPHORESE Gel 40“ (Roth);

ALP substratas „1-Step NBT/BCIP“ (Thermo Scientific);

Amonio persulfatas (APS, Sigma-Aldrich);

Baltymų masės standartas „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific).

Baltymų mėginio paruošimo tirpalas „5× Reducing Sample Buffer“ (Thermo Scientific);

Blokavimo tirpalas „Roti-Block“ (Roth);

Dejonizuotas vanduo;

DMSO (Sigma-Aldrich);

DTT (Thermo Scientific);

Etanolis > 99,8 % (Honeywell);

Fetalinis veršiuko serumas (FBS, angl. Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich);

Gentamicino sulfatas (Roth);

Glicerolis (Roth);

Glicinas (Roth);

Gryninimo kolonėlė „HiTrap Protein A 1 mL“ (Cytiva);

H₂SO₄ (Honeywell);

HCl (Roth);

Jaučio serumo albuminas (BSA, angl. bovine serum albumin, Pan Biotech);

KCl (Roth);

KH₂PO₄ (Roth);

Magnetinės dalelės „Dynabeads Protein A/G for immunoprecipitation“ (Invitrogen);
Metanolis (Roth);
Mikrozid AF skystis paviršių dezinfekcijai (Schülke);
N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diaminas (TEMED, Sigma-Aldrich);
Na₂HPO₄ (Roth);
NaCl (Roth);
NaHCO₃ (Roth);
NaHCO₃ (Roth);
NaN₃ (Roth);
NaOH (Chempur);
Natrio dodecilsulfatas (SDS, angl. Sodium dodecylsulphate, Roth);
Pieno milteliai (Roth);
PMSF proteazių inhibitorius (Thermo Scientific);
Poliakrilamidinio gelio dažas „PageBlue Protein Staining Solution“ (Thermo Fisher Scientific);
Sefarozės dalelės „rProtein G Sepharose Fast Flow“ (Cytiva);
TMB peroksidazės substratas imunofermentinei analizei (Clinical Science Products Inc.);
TRIS (Roth);
TRITON X-100 (Sigma-Aldrich);
Tween-20 (Roth).

2.1.3 Ląstelių auginimo terpės

Ląstelių mitybinė terpė DMEM (PAN-Biotech, Vokietija).

2.1.4 Tirpalai ir terpės

Darbui su hibridomomis: nesteruminė DMEM terpė (DMEM su 200 µg/mL gentamicino), seruminė DMEM terpė (DMEM su 9 % inaktyvuoto FBS ir 200 µg/mL gentamicino), šaldymo terpė (90 % FVS ir 10 % DMSO).

Darbui su antikūnais: fosfatinis buferinis tirpalas (PBS, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4), PBS-T (PBS su 0,1 % Tween-20), sotus (NH₄)₂SO₄ tirpalas.

Antikūnų gryninimui: Glicino-NaCl užnešimo tirpalas (1,5 M glicinas, 3 M NaCl, pH 8,9), TRIS užnešimo tirpalas (1 M TRIS, pH 8), eliucijos tirpalas (100 mM glicinas (pH 3)).

SDS-PAGE, imunoblotingui: baltymų elektroforezės buferinis tirpalas (10×, 247 mM TRIS, 1,92 M glicino, 35 mM SDS, pH 8,3-8,6), 9 % skiriamojo gelio tirpalas (1 geliui: 1,13 mL 40 % akrilamido tirpalo, 1,25 mL 1,5 M TRIS pH 8,8, 0,05 mL 10 % SDS, 0,025 mL 10 % APS, 0,0025 mL TEMED ir vanduo iki 5 mL tūrio), 4 % koncentruojamasis gelis (1 geliui: 0,5 mL 40 % akrilamido tirpalo, 1,25 mL 0,5 M TRIS pH 6,8, 0,05 mL 10 % SDS, 0,025 mL 10 % APS, 0,0025 mL TEMED ir vanduo iki 2,5 mL tūrio), baltymų pernešimo tirpalas (25 mM TRIS, 150 mM glicino, 10 % metanolio), blokavimo ir antikūnų skiedimo tirpalas (PBS su 2 % pieno miltelių).

Imunocheminiam metodams: IP eliacijos tirpalas (20 % „5× Reducing Sample Buffer“ ir 80 % PBS), TRIS buferinis tirpalas (TBS, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl pH 7,4), IFA naudotas imobilizacijos buferinis tirpalas (50 mM NaHCO₃ pH 9,5), 3,6 % H₂SO₄ tirpalas.

2.1.5 Antriniai antikūnai

Ožkos PAK prieš pelės IgG Fc žymėti ALP (SouthernBiotech);

Ožkos PAK prieš žiurkių IgG žymėti HRP (Invitrogen);

Ožkos polikloniniai antikūnai (PAK) prieš pelės IgG sunkiąją ir lengvąją grandines (H+L) žymėti HRP (Bio-Rad);

Pelės PAK prieš žmogaus IgG Fc žymėti HRP (SouthernBiotech).

2.1.6 Rekombinantiniai baltymai

Eksperimentams buvo naudojami Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Eukariotų ir genų inžinerijos skyriuje (VU GMC BTI EGIS) mielėse susintetinti rekombinantiniai HEV kapsidės baltymai: pilno ilgio (1-645 aminorūgštys) žiurkių HEV, sutrumpinti (112-645 aminorūgštys ir 112-608 aminorūgštys) žiurkių HEV ir pilno ilgio (1-660 aminorūgštys) HEV-3 kapsidės baltymai. HEV kapsidės baltymus susintetino ir apibūdino dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė ir dr. Paulius Lukas Tamošiūnas (VU GMC BTI EGIS).

2.2 Įranga, prietaisai ir priemonės

0,2 µm filtrai švirkštams „Minisart RC“ (Sartorius);

0,45 µm filtrinis popierius (Fisherbrand);

0,5, 1,5 ir 5 mL plastikiniai mėgintuvėliai (Eppendorf; Nerbe plus);

1 mL kriomėgintuvėliai ląstelių šaldymui (Fisherbrand);

1,5 mL plastikiniai mėgintuvėliai „Protein LoBind“ (Eppendorf);

12, 96 šulinėlių plokštelės ląstelių kultūrų auginimui (TPP);

15 mL ir 50 mL sterilūs mėgintuvėliai (Nerbe plus);
2 mL švirkštai „BD Discardit II“ (Becton Dickinson);
25 cm² ir 75 cm² ląstelių kultūrų auginimui skirti flakonai (Thermo Scientific);
5, 10, 25, 50 mL sterilūs antgaliai serologinei pipetei (Thermo Scientific);
500 mL filtravimo įranga su 0,2 μm aPES membrana (Fisherbrand);
96 šulinėlių IFA plokštelės Maxisorp ir Polysorp (Nunc);
Audinių homogenizatorius (Bellco Glass);
Automatinės 8 ir 12 kanalų mikrotūrių pipetės (30-300 μL, Thermo Scientific);
Automatinės mikrotūrių pipetės (0,2-2 μL; 10-100 μL; 20-200 μL; 0,5-5 mL; 1-10 mL) (Eppendorf; Thermo Scientific);
Automatinis pipetės valdiklis (Thermo Scientific);
Centrifuga „5424 R“ (Eppendorf);
Centrifuga „Universal 32“ (Hettich Zentrifugen);
Chromatografijos sistema „AKTA start“ (Cytiva);
CO₂ ląstelių inkubatorius (Binder);
Elektroforezės/IB sistema „Standart Power Pack P25“ ir „Minigel-Twin“ (Biometra);
GraphPad Prism 8.4.3 programa;
Hemocitometras *Bürker* (Fisher Scientific);
IB sistema (Biometra);
Inversinis mikroskopas Eclipse TS100 (Nikon);
Laminarinės oro tėkmės spintos (ESCO; Thermo Scientific);
Magnetas „DynaMag-2“ (Invitrogen);
Magnetinė maišyklė (Velp Scientifica);
Orinis termostatas (Mettler);
pH-metras MP220 (METTLER TOLEDO);
Plokštelių purtyklė (IKA);
PVDF membrana su 0,45 μm poromis (Thermo Scientific);
Skaitytuvas „Epson perfection V19“ (Epson);
Spektrofotometras Multiskan GO (Thermo Scientific);
Sterilūs plastikiniai loveliai (Titertek);
Suskystinto azoto dujas Thermolyne Biocane 47 (Thermo Scientific);
Svarstyklės Kern PCB 1000-12 (KERN & SOHN);

Šaldymo įranga -70 °C, -20 °C, 4 °C (New Brunswick Scientific; Liebherr; Snaigė);
Vandeninis termostatas (Mettler);
Vartyklė „Reax 2“ (Heidolph);
Vienkartinės pirštinės (Ansell);
Vienkartiniai automatinių pipetų antgaliai (10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5 mL ir 10 mL) (Nerbe plus; Thermo Scientific, Eppendorf, Fisherbrand).

2.3 Metodai

2.3.1 Monokloninių antikūnų paruošimas

2.3.1.1 Ląstelių atšildymas, kultivavimas ir kriokonservavimas

Ląstelės yra saugomos skystame azote (≈ -196 °C). Iš diuaro su skystu azotu išimama šaldymo ampulė ir nupurškiama dezinfekciniu skysčiu. Laminarinėje traukos spintoje ląstelės yra atšildomos mėgintuvėlio turinį suspenduojant nesterilinėje DMEM terpėje. Ląstelės išsėjamos 10 mL seruminės DMEM terpės į 25 cm² flakonus. Ląstelėms pasidalinus per visą 25 cm² indą, jos persėjamos į 75 cm² flakonus (20 mL augimo terpės) ir juose kultivuojamos, kol vykdomi tyrimai. Siekiant surinkti hibridomų augimo terpę antikūnų gryninimui, kiekviena ląstelių linija auginama 5-6 75 cm² flakonuose. Nustatant ląstelių linijų stabilumą atliekamas ląstelių klonavimas serijiniu skiedimu.

Eksperimentams nebenaudojamos ląstelės yra vėl užšaldomos. Švelniai plaunant flakono dugną terpe ląstelės yra atkeliamos ir suspenduojamos augimo terpėje. Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min 200 × g, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 700 µL šaldymo terpės ir perkeliama į šaldymo ampulės. Šaldymo ampulės su ląstelėmis laikomos šaldiklyje (-70 °C) ir po paros perkeliama į skysto azoto diuarą.

2.3.1.2 Antikūnų gryninimas afinine chromatografija

Iš 5-6 75 cm² flakonų surenkama hibridomų augimo terpė ir centrifuguojama 5 min 200 × g. Supernatantas surenkamas į atskirą butelį ir kaip konservanto įpilama NaN₃ iki galutinės 0,1 % koncentracijos. Antikūnai (IgG klasės) yra gryninami chromatografijos sistema AKTA, naudojant kolonėlę su sorbuotu baltymu A. Terpė yra skiedžiama santykiu 1:2 su Glicino-NaCl užnešimo tirpalu (IgG₁ poklasis) arba 10:1 su 1 M Tris-HCl užnešimo tirpalu (IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ poklasiai). Paruošta terpė filtruojama naudojant 0,45 µm porų filtrus. Vadovaujantis gryninimo su AKTA protokolu chromatografijos sistema plaunama 20 % etanolio, dejonizuotu vandeniu, užnešimo buferiniu tirpalu ir elucijos tirpalu. Sistemą užpildžius užnešimo ir elucijos buferiniais tirpalais paleidžiamas terpės tekėjimas pro kolonėlę, kur antikūnai išgaudomi baltymo A. Antikūnai yra eliuojami elucijos buferiniu

tirpalu. Antikūnų koncentracija eliucijos frakcijose nustatoma spektrofotometriškai ($A = 280 \text{ nm}$). Frakcijos su išmatuotomis antikūnų koncentracijomis yra apjungiamos ir nudruskinamos naudojant PD-10 kolonėlę. Vėl apjungiamos surinktos frakcijos su išmatuotomis antikūnų koncentracijomis ir filtruojama naudojant sterilius $0,2 \mu\text{m}$ porų filtrus.

2.3.2 Imunocheminiai analizės metodai

2.3.2.1 Netiesioginė imunofermentinė analizė

Šiame darbe netiesioginė imunofermentinė analizė (IFA) visų pirma buvo naudota hibridomų augimo terpės testavimui ir išgrynintų antikūnų aktyvumui nustatyti. Vėliau šis metodas naudotas žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymo metodo kūrimui, kuriuo buvo tiriami biologiniai mėginiai, tačiau šie metodai aprašyti 2.3.3 skyriuje. 96 šulinėlių Nunc PolySorp plokštelėje imobilizuojamas antigenas (HEV-3, žiurkių HEV kapsidės baltymai) išpilstant po $50 \mu\text{L}$ į šulinėlį $1\text{--}5 \mu\text{g/mL}$ koncentracijos tirpalą. HEV-3 kapsidės baltymo koncentracija privedama iki $3 \mu\text{g/mL}$ PBS tirpalu, žiurkių HEV (1-645 aminorūgštys) – iki $5 \mu\text{g/mL}$ vandeniu, žiurkių HEV (112–645 aminorūgštys ir 112–608 aminorūgštys) – $3 \mu\text{g/mL}$ imobilizacijos buferiniu tirpalu. Plokštelės inkubuojamos 4°C per naktį. Kitą dieną plokštelės turinys nupilamas ir į šulinėlius išpilstoma po $300 \mu\text{L}$ 10% „Roti-Block“ tirpalo. Plokštelės inkubuojamos 1 h kambario temperatūroje. Blokavimo tirpalas išpilamas, plokštelė praplaunama vandeniu. Ruošiant išgrynintų antikūnų mėginį koncentracija privedama iki $3 \mu\text{g/mL}$ PBS-T tirpalu. Išgrynintų antikūnų arba hibridomų terpių mėginiai išpilstomi į plokštelę po $50 \mu\text{L}$, arba atliekami antikūnų serijiniai skiedimai ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Mėginiai išpilami, plokštelė plaunama 4 kartus $1:1 \text{ PBS-T:H}_2\text{O}$. Antriniai antikūnai (Ožkos PAK prieš pelės IgG (H+L) žymėti HRP) skiedžiami $1:5000 \text{ PBS-T}$, po $50 \mu\text{L}$ išpilstomi į plokštelės šulinėlius ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Po inkubacijos plokštelė plaunama 4 kartus $50:50 \text{ PBS-T:H}_2\text{O}$ ir 2 kartus H_2O . Į šulinėlius išpilstoma po $50 \mu\text{L}$ TMB ir laikoma tamsoje $3\text{--}15 \text{ min}$. Reakcija stabdoma į šulinėlius išpilsčius $25 \mu\text{L}$ $3,6\%$ H_2SO_4 tirpalo. Rezultatai vertinami spektrofotometriškai matuojant sugertį ties 450 nm bangos ilgiu (palyginamasis bangos ilgis 620 nm).

2.3.2.2 Imunoprecipitacija

IP metodu šiame darbe iš sudėtingo biologinio mišinio (ląstelių lizato) buvo izoliuojami HEV kapsidės baltymai. Tam buvo naudojamos magnetinės arba sefarozės dalelės su kovalentiškai prijungtu baltymu A arba G. Pirmiausiai magnetinės arba sefarozės dalelės keturis kartus praplaunamos PBS tirpalu. Naudojant magnetines daleles tirpalai pašalinami pridodant mėgintuvėlius prie magneto. Naudojant sefarozės daleles centrifuguojama 20 s 12000 g ir atsargiai nusiurbiamas supernatantas nuo

nusėdusių dalelių. Vienam IP eksperimento mėginiui naudojama 50 μ L dalelių. Į mėgintuvėlį su dalelėmis įpilama 150 μ L Glicino-NaCl tirpalo su 0,1 % Tween-20 (IgG₁ poklasiui) arba 1 M Tris-HCl tirpalo su 0,1 % Tween-20 (IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ poklasiai). Pridedama 2 μ g antikūno ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje ant vartyklės. Dalelės atskiriamos nuo tirpalo centrifuguojant (sefarozės dalelės) arba dedant prie magneto (magnetinės dalelės), supernatantas pašalinamas, dalelės plaunamos 4 kartus plovimo tirpalu (PBS-T ar TBS, 0,5 % TRITON X-100, 2 mM DTT, ar TBS, 0,1 % SDS, 2mM DTT tirpalu). Į mėgintuvėlius įpilama 200 μ L blokavimo tirpalo (PBS su 2 % BSA, PBS su 2 % pieno miltelių arba 10 % „RotiBlock“ tirpalo) ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje ant vartyklės. Supernatantas pašalinamas, dalelės plaunamos 1 kartą plovimo tirpalu. Įpilama 200 μ L testuojamo mėginio (lizatas, baltymo tirpalas) ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje ant vartyklės. Supernatantas pašalinamas, dalelės plaunamos 4 kartus plovimo tirpalu. Įpilama 30 μ L eliuacijos tirpalo ir inkubuojama 10 min 100 °C. Supernatantas surenkamas ir denatūruoti mėginiai analizuojami SDS-PAGE ar imunoblotingu.

2.3.2.3 Imunoblotingas

Imunoblotingo (IB) metodu yra nustatoma antikūnų sąveika su antigenais. Pirmiausiai yra atliekama baltymų elektroforezė SDS-PAGE. Darbe buvo naudojami 9 % skiriamasis poliakrilamido gelis ir 4 % koncentruojamasis poliakrilamido gelis. Į gelio šulinėlį pilami 5 μ L baltymų masės standarto “Prestained Protein Ladder” ir po 10-20 μ L denatūruoto ir redukuoto baltymų mėginio. Elektroforezė vykdoma 80 V įtampoje, kol mėginiai pereina koncentruojamąjį gelį ir 140 V įtampoje, kol baltymai išsifracionuoja skiriamajame gelyje. Po elektroforezės gelis yra naudojamas pernešimui ant PVDF membranos arba dažomas „PageBlue Protein Staining Solution“ baltymų dažymo tirpalu. Baltymų pernešimui ant PVDF membranos gelis yra merkiamas į baltymų pernešimo buferinį tirpalą. Filtrinis popierius yra suvilgomas baltymų pernešimo tirpale. PVDF membrana yra aktyvuojama metanolyje ir merkiama į baltymų pernešimo buferinį tirpalą. Ant baltymų pernešimo prietaiso katodinio pagrindo dedamas filtrinis popierius, ant jo PVDF membrana, tada poliakrilamidinis gelis ir filtrinis popierius. Gautas „sumuštinis“ užspaudžiamas anodiniu dangčiu ir vykdomas baltymų pernešimas 1 mA/cm² PVDF membranos ploto 1 h. Po pernešimo PVDF membranos yra blokuojamos PBS su 2 % pieno miltelių 1 h kambario temperatūroje arba per naktį 4 °C. Blokavimo tirpalas nupilamas ir ant membranų užpilama 1 μ g/mL MAk 9C8 tirpalo skiesto PBS-T su 2 % pieno miltelių, inkubuojama 1 h kambario temperatūroje ant purtyklės. Pirminių antikūnų tirpalas nupilamas ir membranos plaunamos PBS-T keturis kartus inkubuoiant 2 min ant purtyklės. Užpilami antriniai antikūnai žymėti ALP skiesti 1:2000 PBST su 2 % pieno miltelių, inkubuojama 1 h kambario temperatūroje ant purtyklės. Antrinių antikūnų tirpalas nupilamas ir membranos plaunamos PBS-T keturis kartus inkubuoiant 5 min ant purtyklės.

Antikūno antigeno reakcija ryškinama užpilant 1 mL ALP substrato BCIP/NBT. Membranos išdžiovinamos ir nuskenuojamos skaitytuvu „Epson perfection V19“.

2.3.3 Imunocheminiai biologinių mėginių analizės metodai

2.2.3.1 HEV kapsidės baltymų imunoprecipitacija žiurkių ir šernų kepenų mėginiuose

Žiurkių (lot. *Rattus rattus*) kepenų mėginiai buvo surinkti VU GMC BTI ILS vykdyto projekto MIP-039/2015 metu. Šernų kepenų mėginiai buvo gauti iš Dr. Juozas Grigas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas). Žiurkių kepenų mėginiai buvo laikomi 4 % PFA tirpale 4 °C. Šernų kepenų mėginiai buvo laikomi sausai – 21 °C. IP eksperimentams medicininiu peiliuku buvo atpjaunamas 100 mg kepenų gabaliukas. Naudojant audinių homogenizatorių kepenų gabaliukas buvo mechaniškai ardomas ir lizuojamas pridėjus 1 mL lizės tirpalo (60 mM TRIS (pH 6,8), 10 % glicerolio, 0,1 % SDS, 1 mM PMSF proteazių inhibitorių kokteilis). Kepenų audinio suspensija buvo centrifuguojama 15 000 g 20 min 4 °C. Supernatantas surinktas į atskirą mėgintuvėlį. Kiekvienai IP reakcijai kepenų lizatas buvo skiedžiamas santykiu 1:4 PBS-T.

2.3.3.2 Žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymas žiurkių mėginiuose

Žiurkių krūtinės ertmės skysčio (angl. chest cavity fluid, CCF) mėginiai buvo surinkti VU GMC BTI ILS vykdyto projekto MIP-039/2015 metu. Žiurkių CCF rinktas autopsijos metu perkirpus širdį. Iš žiurkių CCF amonio sulfatu ((NH₄)₂SO₄) išsodinta imunoglobulinų frakcija buvo testuojama netiesiogine IFA žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymui. PolySorp plokštelėje sorbuota 3 µg/mL sutrumpinto (112-608) žiurkių HEV baltymo. Blokavimui, mėginių ir antrinių antikūnų skiedimui naudotas PBS-T su 2 % BSA tirpalas. 200 µg/mL kiekvieno CCF mėginio buvo inkubuojami su pilno ilgio (1-660 aminorūgštys) HEV-3 arba sutrumpintu (112-645 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymu 1 h kambario temperatūroje ant vartyklės. Po inkubacijos mėginiai išpilstyti po 100 µL į šulinėlį ir inkubuoti 1 h kambario temperatūroje. Po plovimo buvo pilta po 100 µL į šulinėlį HRP žymėtų antrinių antikūnų prieš žiurkių IgG Fc fragmentą skiestų 1:2000 ir inkubuota 1 h kambario temperatūroje. Reakcija ryškinta naudojant HRP substratą TMB.

Testuojant žiurkių CCF mėginius netiesiogine IFA be preinkubacijos buvo apskaičiuotas OT ir ribinės vertės santykis. Ribine verte laikytas neimunizuotos žiurkės PAK trijų pakartojimų išmatuoto OT vidurkis + 3 standartiniai nuokrypiai.

Testuojant žiurkių CCF mėginius antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymui (IFA su preinkubacija) buvo apskaičiuotas OT pokytis (ΔOT) po inkubacijos tiek su HEV-3, tiek su žiurkių HEV baltymu:

$$\Delta OT(\text{HEV-3 preinkubuotas}) = OT(\text{nepreinkubuotas}) - OT(\text{HEV-3 preinkubuotas})$$

$$\Delta OT(\text{žiurkių HEV preinkubuotas}) \\ = OT(\text{nepreinkubuotas}) - OT(\text{žiurkių HEV preinkubuotas})$$

Kiekvienam mėginiui toliau buvo apskaičiuotas žiurkių HEV preinkubuito OT pokyčio ir HEV-3 preinkubuito OT pokyčio santykis:

$$\Delta OT(\text{žiurkių HEV preinkubuotas}) / \Delta OT(\text{HEV-3 preinkubuotas})$$

Pagal žiurkių HEV preinkubuito OT pokyčio ir HEV-3 preinkubuito OT pokyčio santykį vertinama, ar mėginyje yra žiurkių HEV specifiskų antikūnų (jei santykis didesnis nei 1), ar nėra (jei santykis mažesnis ar lygus 1).

2.3.3.3 Žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymas žmonių kraujo serumo mėginiuose

Žmonių kraujo serumo mėginiai surinkti vykdant biomedicininį tyrimą „Virusinių ir imunologinių veiksnių, susijusių su inkstų veiklos sutrikimais ir inkstų transplantato atmetimo rizikos vertinimu, tyrimas“ (leidimo nr. 158200-17-901-409) bendradarbiaujant su Vilniaus universitetinė ligoninės Santaros klinikų Nefrologijos centru (gyd. Ernesta Mačionienė). Eksperimentuose buvo naudojama 15 HEV teigiamų kraujo serumo mėginių, apibūdintų komerciniais IFA rinkiniais („Wantai HEV-IgG ELISA“, „Wantai HEV-IgM ELISA“. Neigiamai kontrolei buvo naudojami 5 HEV neigiami mėginiai. PolySorp plokštelėje sorbuota 3 µg/mL sutrumpinto (112-608) žiurkių HEV baltymo. Blokavimui, mėginių ir antrinių antikūnų skiedimui naudotas PBS-T su 2 % BSA tirpalas. Žmonių kraujo serumo mėginiai skiesti santykiu 1:20 buvo inkubuojami su pilno ilgio (1-660 aminorūgštys) HEV-3 arba sutrumpintu (112-645 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymu 1 h kambario temperatūroje ant vartyklės. Po inkubacijos mėginiai išpilstyti po 100 µL į šulinėlį ir inkubuoti 1 h kambario temperatūroje. Po plovimo buvo pilta po 100 µL į šulinėlį HRP žymėtų antrinių antikūnų prieš žmogaus IgG skiestų 1:10000 ir inkubuota 1 h kambario temperatūroje. Reakcija ryškinta naudojant HRP substratą TMB.

Testuojant žmonių kraujo serumo mėginius netiesiogine IFA be preinkubacijos buvo apskaičiuotas OT ir ribinės vertės santykis. Ribine verte laikytas penkių HEV neigiamų žmogaus mėginių OT vidurkis + 3 standartiniai nuokrypiai.

Testuojant žmonių kraujo serumo mėginius antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymui (IFA su preinkubacija) buvo apskaičiuotas žiurkių HEV preinkubuito OT pokyčio ir HEV-3 preinkubuito OT pokyčio santykis. Duomenų analizei ir vaizdinimui naudota GraphPad Prism 8.4.3 programa.

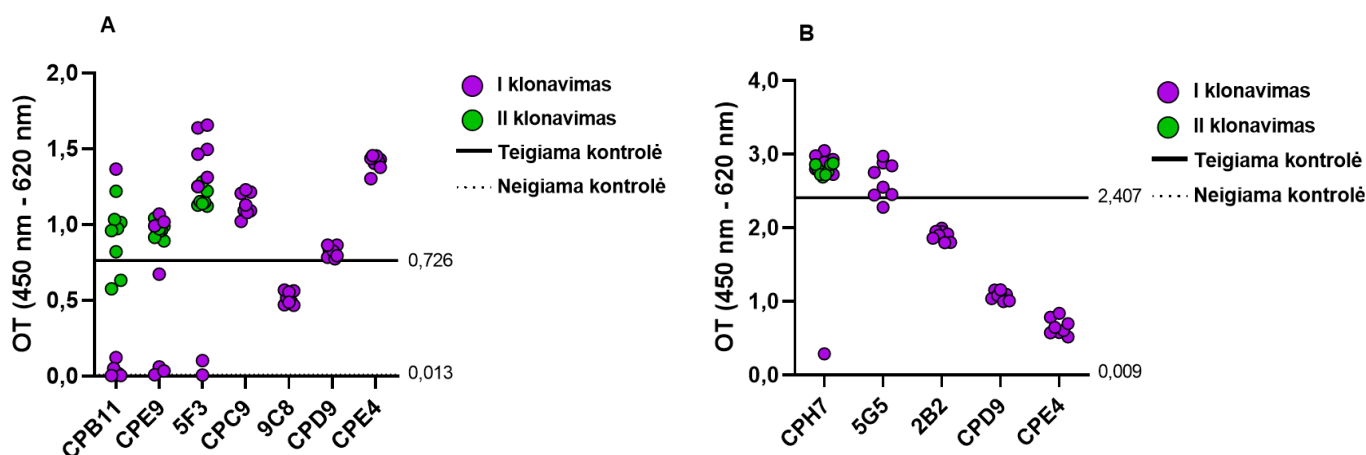
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

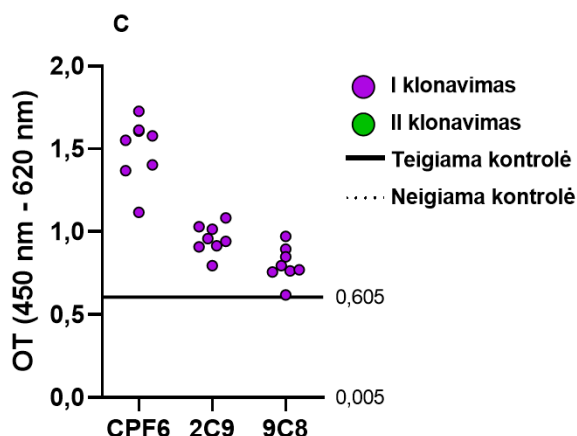
3.1 Monokloninių antikūnų paruošimas

Imunocheminių HEV nustatymo metodų kūrime buvo naudojami monokloniniai antikūnai (MAk), kuriuos gamina hibridomos. Tyrimams naudotos hibridomos buvo sukurtos hibridomų technologija (Dr. Martynas Simanavičius, Dr. Indrė Kučinskaitė-Kodžė). Šios technologijos metu yra suliejamos tiksliniu antigenu (HEV-3 arba žiurkių HEV kapsidės baltymu) imunizuotos pelės (lot. *Mus musculus*) blužnies ląstelės su vėžinėmis mielomos ląstelėmis. Gautos hibridinės ląstelės arba hibridomos pasižymi didelių MAk kiekių gamyba. Darbų metu buvo naudojamos hibridomos gaminančios antikūnus prieš HEV kapsidės baltymus (HEV-3, žiurkių HEV). Bendrai buvo atgaivinta ir kultivuota 12 hibridomų. Pagal turimus duomenis 4 hibridomų (CPB11, CPE9, 5F3, CPC9) gaminami MAk specifiški HEV-3 kapsidės baltymui, 5 hibridomų (CPF6, 2C9, CPH7, 5G5, 2B2) MAk specifiški žiurkių HEV kapsidės baltymui ir 3 hibridomų (9C8, CPD9, CPE4) MAk kryžmiškai specifiški HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams.

3.1.1 Hibridomų auginimas ir stabilizavimas

Monokloninių antikūnų gryninime svarbus ląstelių populiacijos monokloniškumas (stabilumas), kuris nustatomas atliekant ląstelių klonavimus serijinio skiedimo metodu. Hibridomos buvo klonuojamos ir auginamos 96 šul. plokštelėse, o užaugusių monoklonų terpė buvo testuojama netiesiogine IFA antikūnų nustatymui (6 pav.).





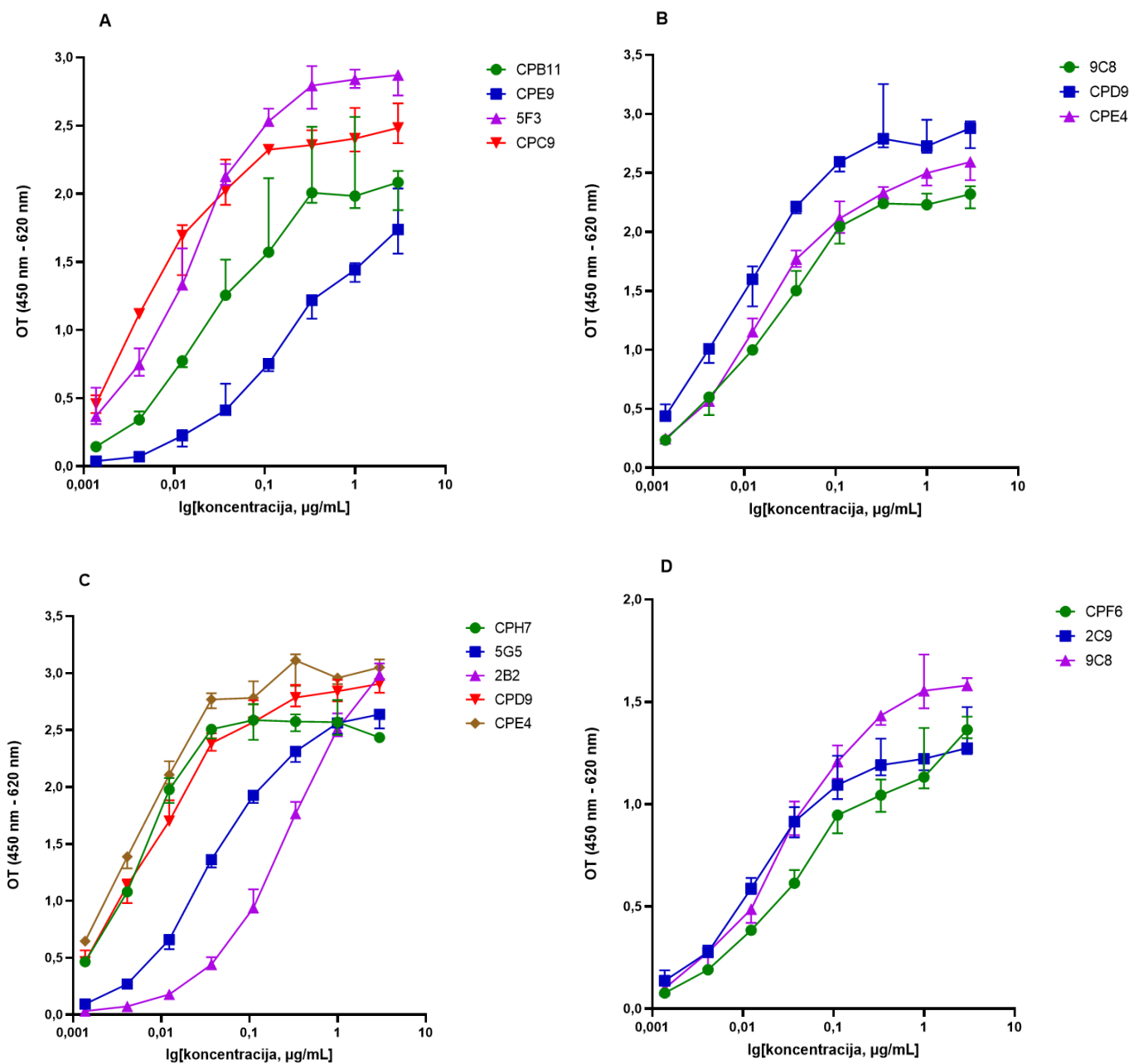
6 pav. Hibridomų klonavimo rezultatai. Užaugusių monoklonų ($7 \leq n \leq 10$) terpės buvo testuojamos netiesiogine IFA. A – HEV-3 kapsidės baltymui specifiški MAk, B – sutrumpintam žiurkių HEV kapsidės baltymui (112-608 aminorūgštys) specifiški MAk, C – pilno ilgio žiurkių HEV kapsidės baltymui (1-645 aminorūgštys) specifiški MAk. Skaičiai dešinėje nurodo teigiamos (pelės polikloniniai antikūnai (PAk) prieš HEV kapsidės baltymus) ir neigiamos (15 % FVS DMEM terpė) kontrolės OT vertes.

Po pirmo klonavimo buvo nustatyta, kad CPC9, 9C8, CPD9, CPE4, 5G5, 2B2, CPF6 ir 2C9 hibridomos stabiliai sekretuoja MAk, todėl pakartotinio klonavimo neprireikė (6 pav.). Taip pat po pirmo hibridomų klonavimo buvo nustatyta, kad CPB11, CPE9, 5F3 ir CPH7 hibridomų linijos buvo nestabilios. Tai reiškia, kad ne visi šių ląstelių linijų monoklonai stabiliai sekretuoja MAk (6 pav., A, B). Dalis šių klonų ląstelių sekretavo antikūnus, kita dalis neseekretavo, todėl stebimas silpnas signalas ($OT \leq 0,2$) (6 pav., A, B). Siekiant atskirti sekretuojančias ląsteles nuo neseekretuojančių buvo atliktas CPB11, CPE9, 5F3 ir CPH7 hibridomų reklonavimas. Po antro klonavimo visų reklonų OT vertės buvo artimos teigiamai kontrolei arba ją viršijo (6 pav., A, B), todėl trečio klonavimo neprireikė.

3.1.2 Monokloninių antikūnų gryninimas ir aktyvumo nustatymas

Visos stabilios hibridomos buvo toliau auginamos 75 cm² flakonuose, o augimo terpė buvo surenkama MAk gryninimui. MAk buvo gryninami afininės chromatografijos su baltymu A metodu naudojant chromatografijos sistemą AKTA. Antikūnų aktyvumas buvo nustatomas netiesioginės IFA metodu skiedžiant antikūnų tirpalą nuo žinomos koncentracijos (3 µg/mL, skiedžiama 1:2 sulyg kiekvienu kitu šulinėliu) (7 pav.).

Analizuojant išgrynintų MAk aktyvumo rezultatus buvo nustatyta, kad signalo stiprumas tiesiogiai priklauso nuo antikūno koncentracijos (7 pav.). Tai rodo, kad MAk sąveikauja su HEV-3 ir žiurkių HEV



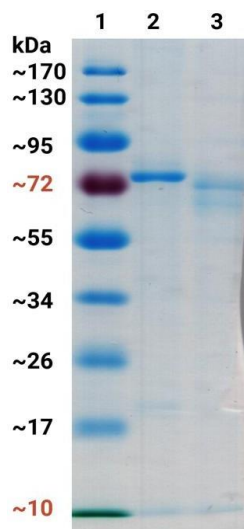
7 pav. Išgrynintų MAK aktyvumo nustatymas netiesiogine IFA. A – HEV-3 kapsidės baltymui specifiški MAK, B – kryžmiškai specifiški MAK, C – sutrumpintam žiurkių HEV kapsidės baltymui specifiški MAK, D – pilno ilgio žiurkių HEV kapsidės baltymui specifiški MAK. A, B – plokštelėje sorbuota 3 µg/mL HEV-3 kapsidės baltymo, C – 3 µg/mL sutrumpinto (112-608 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymo, D – 5 µg/mL pilno ilgio (1-645 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymo.

kapsidės baltymais, todėl didėjant antikūno koncentracijai susidaro daugiau antikūno-antigeno kompleksų, kas lemia stipresnį signalą. Antikūnai CPF6, 2C9 ir 9C8 nesąveikauja su sutrumpintu (112-608 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymu, kas reiškia, kad šių MAk epitopai yra šalia žiurkių HEV kapsidės baltymo C (1-112 aminorūgštys) arba N galo (608-645 aminorūgštys) (Simanavicius et al. 2018). Tai buvo patvirtinta ir šiuo eksperimentu, kadangi MAk CPF6, 2C9 ir 9C8 sąveikavo tik su pilno ilgio (1-645 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymu. Netiesioginės IFA rezultatai rodo, kad visi 12 išgrynintų MAk yra aktyvūs ir gali būti pritaikyti imunocheminių HEV nustatymo metodų kūrimui.

3.2 Imunoprecipitacijos metodo HEV nustatymui kūrimas

Imunocheminiai nustatymo metodai remiasi antikūno-antigeno sąveika. Vienas iš imunocheminių metodų yra imunoprecipitacija (IP). IP naudojamų antikūnų pagalba galima izoliuoti specifinį antigeną (dažniausiai baltymą) iš heterogeniško biologinio mišinio (ląstelių lizato, serumo). Antigenui specifiskas antikūnas yra imobilizuojamas ant kieto paviršiaus – agarozės, sefarožės ar magnetinių dalelių su baltymu A, G arba L. Antikūno-dalelės konjugatas inkubuojamas su mėginiu, ko pasekoje susidaro antikūno-antigeno kompleksai, o atliekant plovimus yra pašalinami nespecifiškai prie kietos fazės prisijungę baltymai. Galiausiai baltymas yra eliuojamas ir analizuojamas SDS-PAGE ar IB.

IP metodą buvo siekiama pritaikyti HEV kapsidės baltymo izoliavimui iš tam tikro mėginio. HEV infekcijos metu kepenyse, kraujyje ir išmatose galima nustatyti HEV virionus (Wang & Meng, 2021),



8 pav. HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų analizė SDS-PAGE. 1 – baltymų molekulinės masės standartas, 2 – HEV-3 kapsidės baltymas (2 µg), 3 – žiurkių HEV kapsidės baltymas (2 µg).

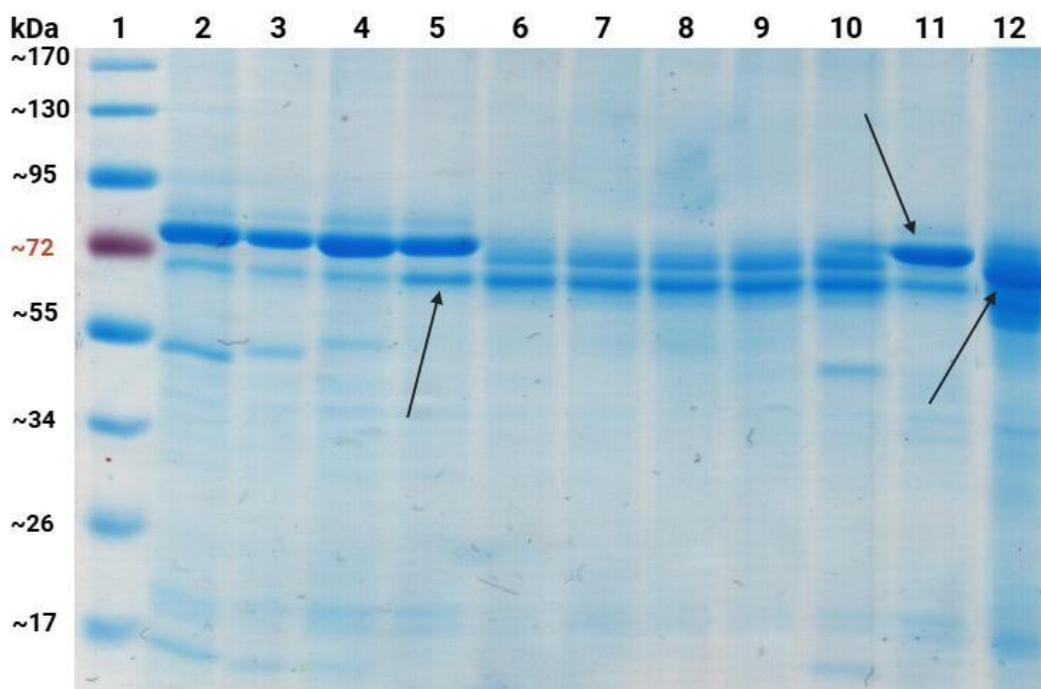
kurių kapsidę formuoja kapsidės baltymas esantis virionų paviršiuje, todėl jis yra prieinamas antikūnams. Dėl šios priežasties HEV nustatymo metodų kūrime taikiniu buvo pasirinktas HEV kapsidės baltymas.

IP eksperimentams buvo naudojami rekombinantiniai HEV-3 (1–660 aminorūgštys) ir žiurkių HEV (1–645 aminorūgštys) kapsidės baltymai (8 pav.). HEV-3 kapsidės baltymo dydis yra ~73 kDa (8 pav., 2 takelis), o žiurkių HEV baltymo dydis ~71 kDa (8 pav. 3 takelis). Iš ankstesnių tyrimų yra žinoma, kad tik žiurkių HEV kapsidės baltymas yra glikozilinamas mielėse (Simanavicius et al. 2018), todėl šis baltymas matomas kaip išsiplėtusi juostelė SDS-PAGE gelio nuotraukoje (8 pav. 3 takelis).

3.2.1 IP magnetinėmis dalelėmis protokolo optimizavimas

Siekiant optimizuoti rekombinantinių HEV kapsidės baltymų IP protokolą, pirmiausia buvo atliekama IP magnetinėmis dalelėmis su baltymu A. HEV-3 kapsidės baltymui specifiski antikūnai CPB11, CPE9, 5F3, CPC9 ir žiurkių HEV kapsidės baltymui specifiski antikūnai CPH7, 2B2, 5G5, 2C9, CPF6 buvo inkubuojami su magnetinėmis dalelėmis padengtomis baltymu A. Blokavimas atliktas PBS su 2 % BSA tirpalu. 10 µg HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų buvo tirpinami 200 µL PBS-T ir inkubuojami su magnetinėmis dalelėmis ir prie jų prikibusiais antikūnais. Neigiamai kontrolei HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai buvo inkubuoti su magnetinėmis dalelėmis, kurios nebuvo inkubuotos su antikūnais (9 pav. 11, 12 takeliai). Eliucijos mėginiai naudoti SDS-PAGE analizei (9 pav.).

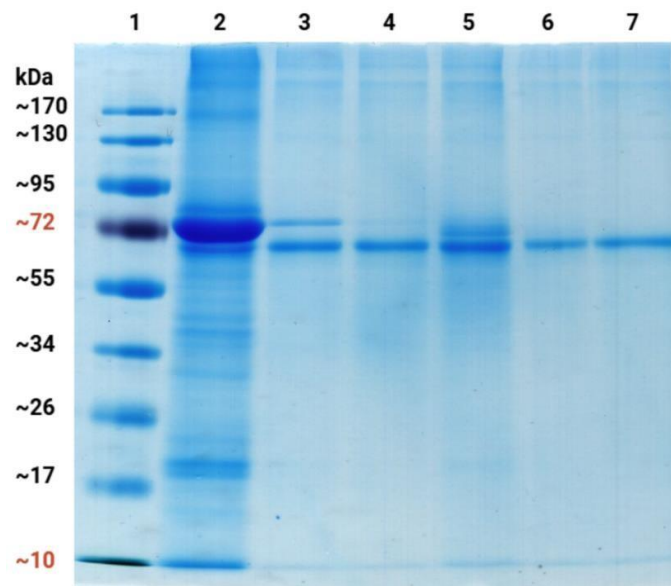
SDS-PAGE rezultatai rodo, kad tiek HEV-3, tiek žiurkių HEV kapsidės baltymai yra galutiniame eliacijos mėginyje (9 pav. 11-12 takeliai, juodos rodyklės dešinėje). HEV kapsidės baltymai neturėtų jungtis prie magnetinių dalelių, kurios nebuvo padengtos specifiskais antikūnais. Dėl šios priežasties negalima daryti išvados, kad antikūnai sėkmingai išgaudo HEV kapsidės baltymus, nepaisant to, kad mėginiuose su antikūnais taip pat matomos baltymo juostelės (9 pav. 2-10 takeliai). Manome, kad



9 pav. Imunoprecipitacijos magnetinėmis dalelėmis rezultatų analizė SDS-PAGE. 2-5, 11 takeliai – naudota 10 µg HEV-3 baltymo, 6-10,12 takeliai – naudota 10 µg žiurkių HEV baltymo. 2-10 takeliai – naudota 2 µg antikūno. 1 – baltymų masės standartas, 2 – ant magnetinių dalelių paviršiaus imobilizuotas antikūnas CPB11, 3 – antikūnas CPE9, 4 – antikūnas 5F3, 5 – antikūnas CPC9, 6 – antikūnas CPH7, 7 – antikūnas 2B2, 8 – antikūnas 5G5, 9 – antikūnas 2C9, 10 – antikūnas CPF6, 11,12 – antikūno nedėta (neigiama kontrolė).

kapsidės baltymai sudarė nespecifines sąveikas su magnetinėmis dalelėmis arba baltymu A. Taip pat yra tikimybė, kad kapsidės baltymai „limpa“ prie mėgintuvėlio sienelių, nors IP eksperimentams buvo naudoti „Protein LoBind“ mėgintuvėliai. SDS-PAGE gelio nuotraukoje kiekviename mėginyje matosi juostelės ties ~70 kDa (9 pav. 5 takelis, juoda rodyklė kairėje). Šis baltymas yra nežinomas, kadangi jo ilgis nesutampa su IP dalyvaujančių baltymų ilgiais (BSA (66 kDa), Baltymas A (30 kDa)).

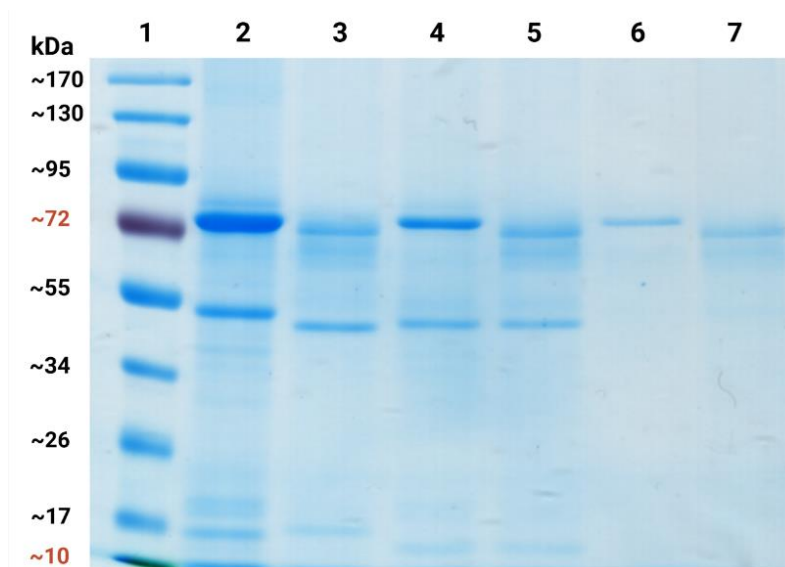
Siekiant nustatyti, ar HEV kapsidės baltymai sudaro nespecifines sąveikas su magnetinėmis dalelėmis ir ar sąveikų kiekis priklauso nuo baltymo koncentracijos mėginyje buvo atlikta IP be antikūnų. HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai buvo inkubuojami su magnetinėmis dalelėmis 1 h, tada mėginiai buvo kruopščiai plaunami PBS-T. Papildomai po plovimų visi mėginiai buvo perkelti į naujus mėgintuvėlius, tam kad potencialiai prie mėgintuvėlio sienelių nespecifiškai prisijungę baltymai nepatektų į galutinį mėginį plovimų ar eliacijos metu. Gauti eliacijos mėginiai naudoti SDS-PAGE analizei (10 pav.).



10 pav. HEV kapsidės baltymų inkubacijos su magnetinėmis dalelėmis rezultatų analizė SDS-PAGE. 1 – baltymų masės standartas, 2 – inkubuota 5 µg HEV-3 kapsidės baltymo, 3 – 1 µg HEV-3 kapsidės baltymo, 4 – 0,1 µg HEV-3 kapsidės baltymo, 5 – 5 µg žiurkių HEV kapsidės baltymo, 6 – 1 µg žiurkių HEV kapsidės baltymo, 7 – 0,1 µg žiurkių HEV kapsidės baltymo.

Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad HEV kapsidės baltymai sudaro nespecifines sąveikas su magnetinėmis dalelėmis, o sąveikų kiekis yra proporcingas kapsidės baltymų koncentracijai (10 pav.). Taip pat kiekviename mėginyje vėl stebima juostelė ties ~70 kDa. Siekiant sumažinti nespecifinių sąveikų skaičių, buvo atliekama IP naudojant įvairius blokavimo tirpalus: PBS su 2 % BSA, PBS su 2 % pieno miltelių, 10 % RotiBlock. Atlikus eksperimentą rezultatai išliko nepakitę – SDS-PAGE gelyje matėsi ryškios kapsidės baltymų juostelės (1 priedas). Nespecifinių sąveikų išvengti buvo bandoma skiedžiant kapsidės baltymus PBS-T su 2 mM DTT tirpalu arba skiedimui naudojant „Assay Defender“ tirpalą, tačiau toks eksperimentas taip pat nedavė teigiamo rezultato (2 priedas).

IP magnetinėmis dalelėmis su baltymu A nebuvo efektyvi, todėl toliau buvo atlikta IP magnetinėmis dalelėmis su baltymu G (11 pav.). HEV-3 kapsidės baltymui specifiškas antikūnas CPB11, žiurkių HEV kapsidės baltymui specifiškas antikūnas CPH7 ir kryžmiškai specifiškas antikūnas 9C8 buvo inkubuojami su magnetinėmis dalelėmis padengtomis baltymu G. Po blokavimo 2 % BSA tirpalu 3 µg HEV-3 ir 5 µg žiurkių HEV kapsidės baltymų buvo tirpinami 200 µL PBS-T ir inkubuojami su magnetinės dalelės-antikūno kompleksais. Neigiamai kontrolei HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės



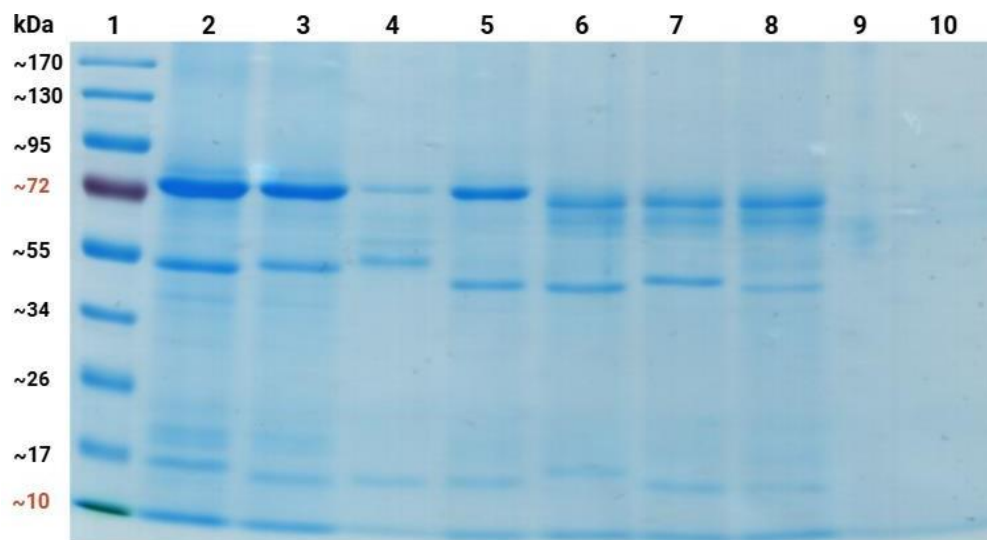
11 pav. Imunoprecipitacijos magnetinėmis dalelėmis rezultatų analizė SDS-PAGE. 2,4,6 takeliai – naudota 3 µg HEV-3, 3, 5, 7 – naudota 5 µg žiurkių HEV. 1 – baltymų masės standartas, 2 – antikūnas CPB11, 3 – antikūnas CPH7, 4,5 – antikūnas 9C8, 6,7 – antikūno nedėta (neigiama kontrolė).

baltymai buvo inkubuoti su magnetinėmis dalelėmis, kurios nebuvo inkubuotos su antikūnais. SDS-PAGE gelyje juostelės ties 50-55 kDa žymi eksperimente naudotą MAK sunkiąją grandinę (11 pav. 2-5 takeliai). Rezultatai parodė, kad HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai sudaro nespecifines sąveikas su magnetinėmis dalelėmis su baltymu G (11 pav., 6-7 takeliai). Taigi, dėl HEV kapsidės baltymų

nespecifinių sąveikų su magnetinėmis dalelėmis negalime daryti išvadų apie antikūnų tinkamumą HEV-3 ir žiurkių HEV baltymų imunoprecipitacijai. Be to, atlikus eksperimentą su baltymu G juostelės ties ~70 kDa nebuvo, todėl potencialiai magnetinės dalelės su baltymu A buvo užterštos kitu baltymu.

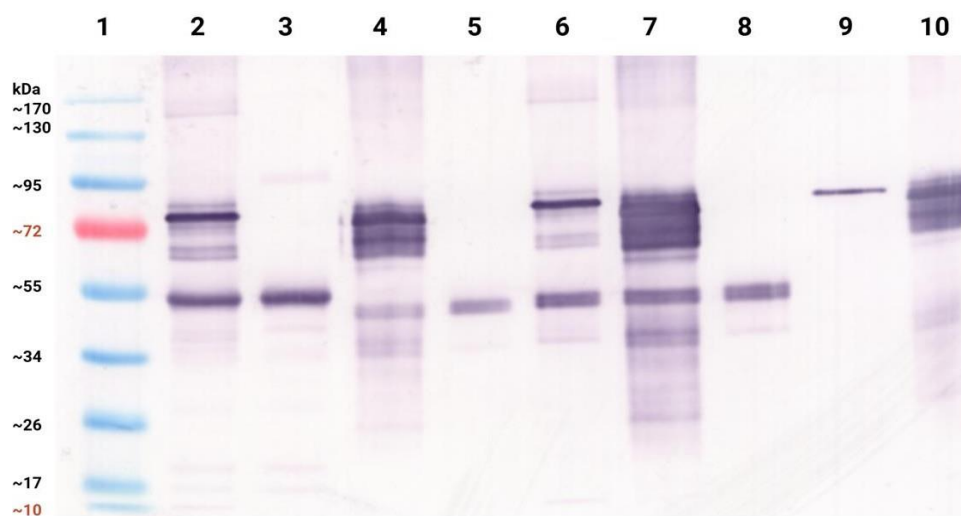
3.2.2 IP sefarožės dalelėmis protokolo optimizavimas

IP magnetinėmis dalelėmis nebuvo efektyvi dėl HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų nespecifinių sąveikų su dalelėmis. Galimai HEV kapsidės baltymai sudaro nespecifines sąveikas būtent su metalo dalelėmis, todėl toliau buvo atliekama IP su sefarožės dalelėmis su imobilizuotu baltymu G. HEV-3 baltymui specifiški antikūnai CPB11, CPE9, 5F3 ir CPC9 bei žiurkių HEV baltymui specifiški antikūnai CPH7, CPF6, 5G5 buvo inkubuojami su sefarožės dalelėmis. Po blokavimo PBS-T su 2 % BSA tirpalu dalelės buvo inkubuojamos su 3 μ g HEV-3 arba 5 μ g žiurkių HEV baltymo. SDS-PAGE gelio nuotraukoje matyti, kad juostelių ties 73 kDa (HEV-3) ir ties 71 kDa (žiurkių HEV) nėra (12 pav., 9-10 takeliai). Tuo tarpu mėginiuose su antikūnais juostelės ties kapsidės baltymais yra matomos (12 pav., 2-8 takeliai). Lyginant HEV kapsidės baltymų IP magnetinėmis (9, 10, 11 pav.) ir sefarožės dalelėmis (12 pav.) matomas akivaizdus nespecifinių sąveikų kiekio sumažėjimas naudojant sefarožės daleles. Dėl šios priežasties tolesniuose IP metodo optimizavimo etapuose buvo naudotos sefarožės dalelės.



12 pav. Imunoprecipitacijos sefarožės dalelėmis rezultatų analizė SDS-PAGE. 2-5, 9 takeliai – naudota 3 μ g HEV-3 baltymo, 6-8, 10 takeliai – naudota 5 μ g žiurkių HEV baltymo. 2-8 takeliai – naudota 2 μ g antikūno. 1 – baltymų masės standartas, 2 – ant sefarožės dalelių paviršiaus imobilizuotas antikūnas CPB11, 3 – antikūnas CPE9, 4 – antikūnas 5F3, 5 – antikūnas CPC9, 6 – antikūnas CPH7, 7 – antikūnas CPF6, 8 – antikūnas 5G5, 9,10 – antikūno nedėta (neigiama kontrolė).

HEV kapsidės baltymų nustatymo iš kepenų mėginių metu kepenų audinio gabaliukai yra lizuojami. HEV infekuotose ląstelėse viruso kapsidės baltymas yra lokalizuotas citoplazmoje (Zafrullah et al., 1999), todėl suardžius ląstelės plazminę membraną HEV kapsidės baltymas patenka į lizatą ir gali būti detektuojamas IP. Siekiant optimizuoti IP metodo protokolą HEV kapsidės baltymų nustatymui iš kepenų mėginių, toliau buvo atliekama HEV kapsidės baltymų IP iš ląstelių lizatų. HEV-3 kapsidės baltymui specifiskas antikūnas CPB11, žiurkių HEV kapsidės baltymui specifiskas antikūnas CPH7 ir kryžmiškai specifiskas antikūnas 9C8 buvo inkubuojami su sefarozės dalelėmis padengtomis baltymu G. HEK293 ląstelės buvo lizuojamos lizės tirpalu (60 mM TRIS (pH = 6,8), 10 % glicerolio, 0,1 % SDS). Vienai IP reakcijai buvo lizuota 2×10^5 HEK293 ląstelių. Į lizatą buvo pridėdama 3 μ g HEV-3 arba 5 μ g žiurkių HEV kapsidės baltymo ir inkubuojama su sefarozės dalelėmis bei prie jų prikibusiais antikūnais. Eliucijos mėginiai naudoti IB analizei (13 pav.).

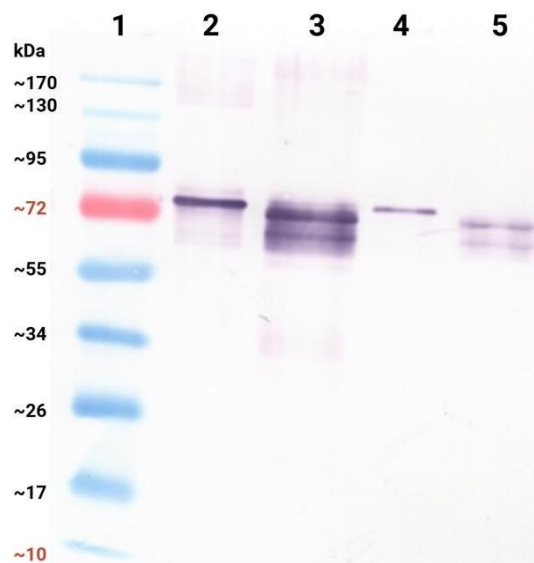


13 pav. Imunoprecipitacijos sefarozės dalelėmis rezultatų analizė imunoblotingu. 2, 6, 9 takeliai – naudota 3 μ g HEV-3 baltymo, 4, 7, 10 takeliai – naudota 5 μ g žiurkių HEV baltymo. 2-8 takeliai naudota 2 μ g antikūno. 1 – baltymų masės standartas, 2 – antikūnas CPB11 ir HEV-3, 3 – antikūnas CPB11 (be baltymo), 4 – antikūnas 5G5 ir žiurkių HEV, 5 – antikūnas 5G5 (be baltymo), 6 – antikūnas 9C8 ir HEV-3, 7 – antikūnas 9C8 ir žiurkių HEV, 8 – antikūnas 9C8 (be baltymo), 9,10 – antikūno nedėta (neigiama kontrolė).

IB rezultatai rodo, kad IP sefarozės dalelėmis būdu galima sėkmingai izoliuoti HEV kapsidės baltymus iš HEK293 ląstelių lizato (13 pav. 2, 4, 6, 7 takeliai). Tuo tarpu kitų baltymų esančių ląstelių lizate naudoti antikūnai nesuriša, kas patvirtina MAk specifiskumą HEV kapsidės baltymams (13 pav. 3, 5, 8 takeliai). Nepaisant to HEV kapsidės baltymai visgi sudaro nespecifines sąveikas su sefarozės dalelėmis (13 pav. 9, 10 takeliai), tačiau lyginant su antikūnų mėginiais (6 pav. 2, 4, 6, 7 takeliai) signalas

nėra toks ryškus. SDS-PAGE nėra toks jautrus metodas kaip IB, todėl pirmame IP su sefarožės dalelėmis eksperimente gelyje nesimato juostelių ties neigiamą kontrolę (12 pav.).

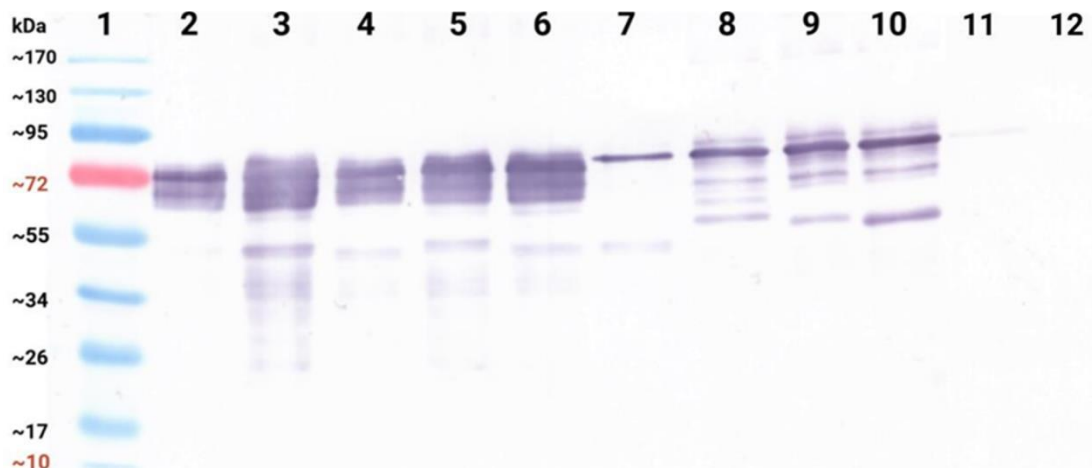
HEV kapsidės baltymų IP sefarožės dalelėmis eksperimentai parodė, kad nespecifinių sąveikų kiekis sumažėja, lyginant su IP magnetinėmis dalelėmis, tačiau IB signalas vis dar gana stiprus. Siekiant dar labiau sumažinti nespecifinių sąveikų skaičių buvo atliekama IP naudojant skirtingus plovimo tirpalus: TBS, 0,5 % TRITON X-100, 2 mM DTT ir TBS, 0,01 % SDS, 2mM DTT. 3 µg HEV-3 ir 5 µg žiurkių HEV kapsidės baltymo buvo inkubuojami su HEK293 ląstelių lizatu ir sefarožės dalelėmis 1 h, tada mėginiai buvo kruopščiai plaunami tiriamais plovimo tirpalais. Papildomai po plovimų visi mėginiai buvo perkelti į naujus mėgintuvėlius. Eliucijos mėginiai naudoti IB analizei (14 pav.)



14 pav. HEV kapsidės baltymų inkubacijos su sefarožės dalelėmis rezultatų analizė imunoblotingu. 2, 4 takeliai – naudota 3 µg HEV-3 baltymo, 3, 5 takeliai – naudota 5 µg žiurkių HEV baltymo. 1 – baltymų masės standartas, 2,3 takeliai – plovimai atlikti TBS, 0,5 % TRITON X-100, 2 mM DTT tirpalu, 4,5 takeliai – plovimai atlikti TBS, 0,01 % SDS, 2mM DTT tirpalu.

Remiantis IB rezultatais galima teigti, kad plovimo tirpalas sudėtyje turintis SDS (14 pav. 4,5 takeliai) atplauna nespecifiškai prisijungusius HEV kapsidės baltymus žymiai geriau negu Triton X-100 sudėtyje turintis plovimo tirpalas (14 pav. 2, 3 takeliai). Nepaisant to nespecifinės sąveikos rezultatuose vis dar stebimos, todėl toliau buvo atlikta IP naudojant didesnę SDS koncentraciją (0,1 %) plovimo tirpale. HEV-3 kapsidės baltymui specifiški antikūnai CPB11, CPE9, 5F3, CPC9 ir žiurkių HEV kapsidės baltymui specifiški antikūnai CPH7, CPF6, 5G5, 2B2, 2C9 buvo inkubuojami su sefarožės dalelėmis. Tada sefarožės dalelės su prisijungusiais antikūnais buvo inkubuojamos su HEK293 ląstelių lizatu ir jame suspenduotais HEV kapsidės baltymais. Mėginiai buvo kruopščiai plaunami TBS, 0,1 % SDS, 2mM

DTT tirpalu. Papildomai po plovimų visi mėginiai buvo perkelti į naujus mėgintuvėlius. Eliucijos mėginiai naudoti IB analizei (15 pav.).

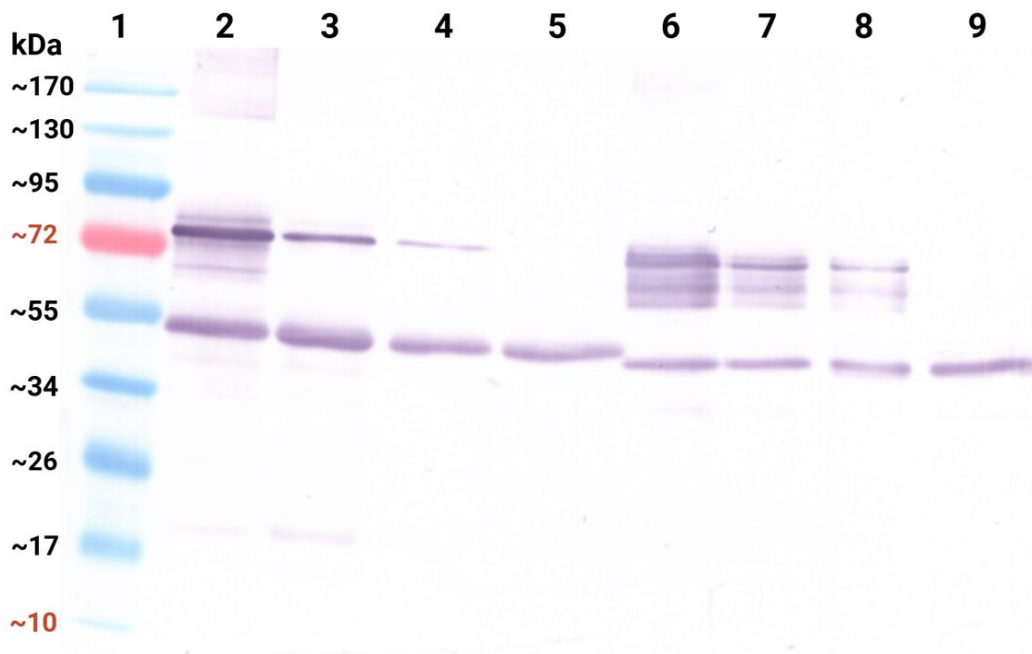


15 pav. Imunoprecipitacijos sefarožės dalelėmis rezultatų analizė imunoblotingu. 2-6, 12 takeliai – naudota 5 µg žiurkių HEV baltymo, 7-11 takeliai – naudota 3 µg HEV-3 baltymo. 2-10 takeliai naudota 2 µg antikūno. 1 – baltymų masės standartas, 2 – antikūnas 2B2, 3 – antikūnas 2C9, 4 – antikūnas 5G5, 5 – antikūnas CPF6, 6 – antikūnas CPH7, 7 – antikūnas CPC9, 8 – antikūnas 5F3, 9 – antikūnas CPE9, 10 – antikūnas CPB11, 11, 12 – antikūno nedėta (neigiama kontrolė).

Iš IB membranos nuotraukos matyti, kad plovimas TBS, 0,1 % SDS, 2mM DTT tirpalu pašalina didžiąją dalį nespecifinių sąveikų tarp HEV kapsidės baltymų ir sefarožės dalelių (15 pav. 11, 12 takeliai). Tuo tarpu antikūnai nepraranda gebėjimo efektyviai precipituoti HEV kapsidės baltymų (15 pav. 2-10 takeliai), kadangi plovimo tirpalas nesuardo stiprios sąveikos tarp antikūno ir HEV kapsidės baltymo. Dėl savo efektyvumo TBS, 0,1 % SDS, 2mM DTT plovimo tirpalas buvo naudojamas tolesniuose tyrimuose. Be to, šis eksperimentas parodo, kad IP metodu pavyksta precipituoti HEV kapsidės baltymus suspenduotus HEK293 ląstelių lizate. Tai leidžia kelti hipotezę, kad HEV kapsidės baltymus pavyks detektuoti ir iš kepenų ląstelių lizato.

IP metodu nustatant HEV kapsidės baltymus svarbu žinoti mažiausią baltymo kiekį, kurį šiuo metodu galima detektuoti. Eksperimentas, kuriuo bus nustatytas mažiausias detektuojamas kapsidės baltymo kiekis padėtų apsibrėžti metodo jautrumą ir nustatyti minimalų mėginio kiekį ar baltymo koncentraciją, nuo kurios galima tikėtis IB signalo, o tai užtikrintų IP metode naudojamų reagentų ir mėginių taupų naudojimą. HEV-3 baltymui specifiskas antikūnas CPB11 ir žiurkių HEV baltymui specifiskas antikūnas CPH7 buvo inkubuojami su sefarožės dalelėmis. Į HEK293 ląstelių lizatą buvo pridedami skirtingi HEV-3 baltymo (0,3 µg, 0,1 µg, 0,05 µg, 0,01 µg) ir žiurkių HEV baltymo (1 µg, 0,8 µg, 0,4 µg, 0,2 µg) kiekiai. Sefarožės dalelės su prisijungusiais antikūnais buvo inkubuojamos su

HEK293 ląstelių lizatu bei jame suspenduotais HEV kapsidės baltymais. Eliucijos mėginiai naudoti IB analizei (16 pav.).

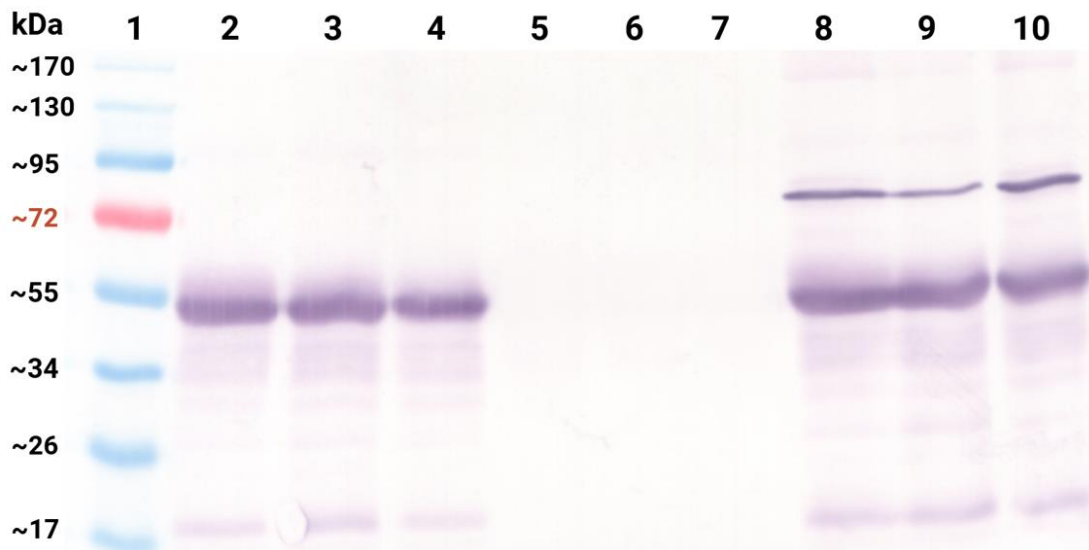


16 pav. Imunoprecipitacijos sefarozės dalelėmis rezultatų analizė imunoblotingu. 2-5 takeliai – naudota 2 μ g antikūno CPB11, 6-9 takeliai – naudota 2 μ g antikūno CPH7. 1 – baltymų masės standartas, 2 – 0,3 μ g HEV-3, 3 – 0,1 μ g HEV-3, 4 – 0,05 μ g HEV-3, 5 – 0,01 μ g HEV-3, 6 – 1 μ g žiurkių HEV, 7 – 0,8 μ g žiurkių HEV, 8 – 0,4 μ g žiurkių HEV, 9 – 0,2 μ g žiurkių HEV.

HEV kapsidės baltymų titravimo eksperimentas parodė, kad IB signalo stiprumas tiesiogiai priklauso nuo HEV kapsidės baltymo kiekio IP reakcijoje (16 pav.). Iš IB membranos nuotraukos matyti, kad signalas vis dar matomas į reakciją pridėjus 0,05 μ g HEV-3 baltymo (16 pav. 4 takelis) arba 0,4 μ g žiurkių HEV baltymo (16 pav. 8 takelis). Tuo tarpu pridėjus 0,01 μ g HEV-3 baltymo (16 pav. 5 takelis) arba 0,2 μ g žiurkių HEV baltymo (16 pav. 9 takelis) signalas dingsta. Šie rezultatai parodo, kad šia IP-IB metodų kombinacija galima sėkmingai precipituoti ir detektuoti 0,05 μ g HEV-3 baltymo ir 0,4 μ g žiurkių HEV baltymo ištirpintų HEK293 ląstelių lizate. Be to, gebėjimas precipituoti tokius mažus tikslinio baltymo kiekius iš sudėtingo biologinio mišinio dar kartą parodo naudojamų antikūnų aukštą specifiškumą HEV kapsidės baltymams.

Natūralios infekcijos metu pagrindinė HEV replikacijos vieta yra kepenų ląstelės hepatocitai (Sayed et al., 2020). Dėl šios priežasties kepenų audinys yra tinkamiausias norint nustatyti HEV infekciją realiuose mėginiuose. Siekiant ateityje pritaikyti mūsų IP metodą realių mėginių tyrimams, svarbu nustatyti ar metodas veikia su kepenų lizatais. Eksperimentams buvo naudojami trijų šernų (lot. *Sus*

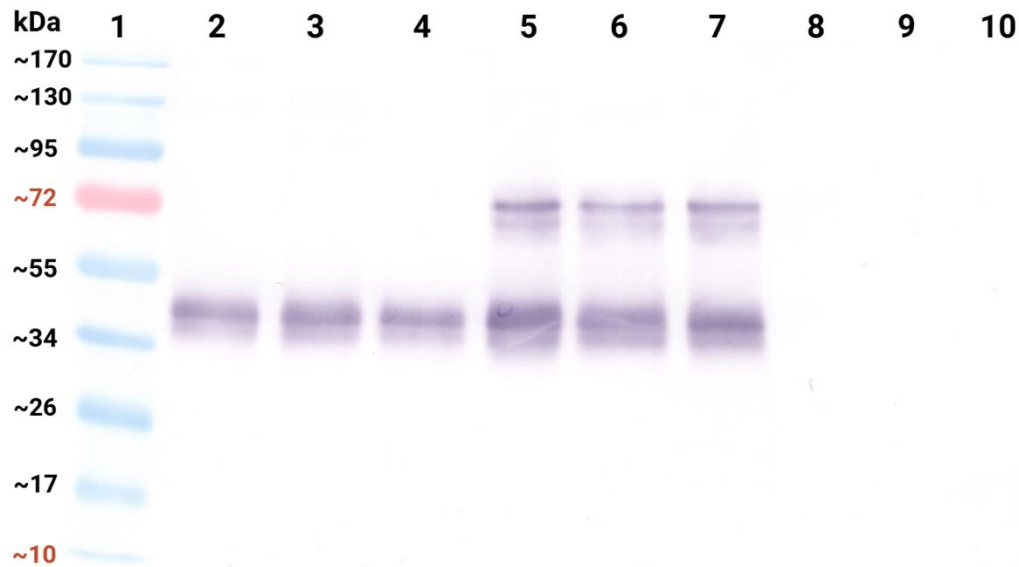
scrofa) ir trijų žiurkių (lot. *Rattus rattus*) kepenų mėginiai. Visų pirma buvo atliktas eksperimentas naudojant trijų šernų (identifikacijos nr. K01, K05, K06) kepenų mėginius. HEV-3 baltymui specifiskas antikūnas CPB11 buvo inkubuojamas su sefarozės dalelėmis. Vienai IP reakcijai buvo naudota 40 µL kepenų lizato ir 160 µL PBS-T. Į atskiestą lizatą buvo pridėta 0,05 µg HEV-3 baltymo ir inkubuota su sefarozės dalelėmis ir prie jų prisijungusiais antikūnais. Taip pat kiekvienam kepenų mėginiui buvo atlikta IP reakcija nepridedant HEV-3 baltymo. Neigiamai kontrolei lizatas buvo inkubuojamas su sefarozės dalelėmis, nepadengtomis antikūnais. Eliucijos mėginiai naudoti IB analizei (17 pav.).



17 pav. Imunoprecipitacijos sefarozės dalelėmis rezultatų analizė imunoblotingu. 2-4, 8-10 takeliai – naudota 2 µg antikūno CPB11. 1 – baltymų masės standartas, 2 – K01 mėginys, 3 – K05 mėginys, 4 – K06 mėginys, 5 – K01 mėginys (be antikūno), 6 – K05 mėginys (be antikūno), 7 – K06 mėginys (be antikūno), 8 – K01 mėginys ir 0,05 µg HEV-3 baltymo, 9 – K05 mėginys ir 0,05 µg HEV-3 baltymo, 10 – K06 mėginys ir 0,05 µg HEV-3 baltymo.

IB rezultatai parodė, kad pagal mūsų HEV nustatymo metodą visi trys šernų kepenų mėginiai yra HEV-3 neigiami, kadangi juostelės ties HEV-3 baltymu IB membranos nuotraukoje nematyti (17 pav. 2-4 takeliai). Tuo tarpu į šernų kepenų lizatus pridėjus 0,05 µg HEV-3 baltymo matomas IB signalas (17 pav., 8-10 takeliai). Tai parodo, kad iš šernų kepenų lizato galima sėkmingai precipituoti ir detektuoti 0,05 µg HEV-3 baltymo. Įdomu tai, kad mėginiuose, kur buvo pridėta 0,05 µg HEV-3 baltymo, juostelės ties HEV-3 baltymu yra ryškios (17 pav., 8-10 takeliai), lyginant su eksperimentu, kur HEV-3 baltymas buvo precipituojamas iš HEK293 ląstelių lizato (16 pav., 4 takelis). Viena iš priežasčių galėtų būti ta, kad lizės tirpalo sudėtyje esantis PMSF proteazių inhibitorių kokteilis apsaugo HEV-3 baltymą nuo degradacijos ir denatūravimo. Tuo tarpu į HEK293 ląstelių lizei naudotą tirpalą proteazių inhibitorių

Eksperimentas, kurio metu HEK293 ląstelių lizate buvo precipituotas žiurkių HEV kapsidės baltymas, parodė, kad 0,4 µg žiurkių HEV baltymo galima sėkmingai precipituoti ir detektuoti IB metodu (16 pav., 8 takelis). Žiurkių HEV RNR aptinkama infekuotų žiurkių kepenyse (Ryll et al., 2017a), kas patvirtina viruso replikaciją ir lokalizaciją kepenų audinyje. Siekiant nustatyti ar 0,4 µg žiurkių HEV baltymo galima detektuoti iš kepenų lizato buvo atlikta IP su trijų žiurkių (identifikacinis numeris R127, R128, R130) kepenų mėginiais. Žiurkių HEV baltymui specifiskas antikūnas CPH7 buvo inkubuojamas



su sefarozės dalelėmis. Vienai IP reakcijai buvo naudota 40 µL kepenų lizato ir 160 µL PBS-T. Į atskiestą lizatą buvo pridėta 0,4 µg žiurkių HEV baltymo ir inkubuota su sefarozės dalelėmis ir prie jų prisijungusiais antikūnais. Kiekvienam žiurkių kepenų mėginiui buvo atlikta IP reakcija nepridedant žiurkių HEV baltymo. Neigiamai kontrolei lizatas buvo inkubuojamas su sefarozės dalelėmis, nepadengtomis antikūnais. Eliucijos mėginiai naudoti IB analizei (18 pav.).

43

sėkmingai precipituoti ir detektuoti 0,4 µg žiurkių HEV baltymo. Kaip ir eksperimente su šernų kepenų lizatais, taip ir šiame eksperimente signalas ties kapsidės baltymu IB membranoje yra ryškesnis, lyginant su IP iš HEK293 ląstelių lizato. Manome, kad lizės tirpale naudotas PMSF proteazių inhibitorių kokteilis apsaugo žiurkių HEV baltymą nuo degradacijos ir denatūravimo.

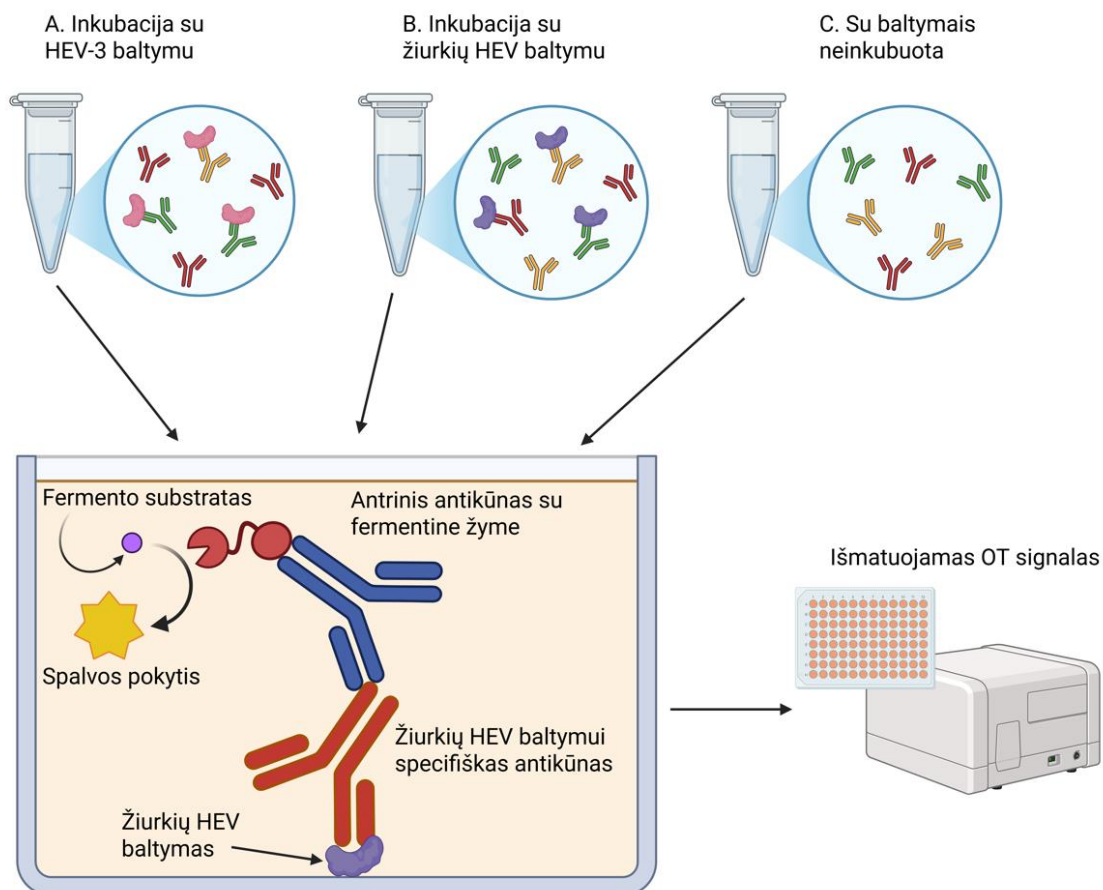
HEV kapsidės baltymų IP iš kepenų mėginių iki šiol nėra aprašyta, todėl nėra žinoma koks HEV kapsidės baltymo kiekis gali būti detektuojamas natūraliai infekuotose kepenyse. Šiame darbe eksperimentai su natūraliai infekuotomis kepenimis taip pat nebuvo atliekami, todėl negalima daryti išvadų apie IP metodo tinkamumą HEV kapsidės baltymų nustatymui iš kepenų mėginių. Nepaisant to, atliekant IP metodo optimizavimo eksperimentus išgryninti MAk buvo sėkmingai pritaikyti HEV kapsidės baltymų IP. Lyginant IP metodui naudojamas magnetines daleles su sefarožės dalelėmis buvo pasirinktos sefarožės dalelės su baltymu G, su kuriom HEV kapsidės baltymai sudaro mažiau nespecifinių sąveikų. Taip pat buvo pagamintas veiksmingas plovimo tirpalas (TBS, 0,1 % SDS, 2mM DTT tirpalu), kuris pašalina didžiąją dalį nespecifinių sąveikų tarp HEV kapsidės baltymų ir sefarožės dalelių. Atlikus IP su skirtingomis baltymo koncentracijomis buvo nustatyta, kad šiuo metodu vienoje IP reakcijoje galima detektuoti 0,05 µg HEV-3 ir 0,4 µg žiurkių HEV kapsidės baltymo. Eksperimentai su žiurkių ir šernų kepenimis parodė, kad mūsų MAk sėkmingai precipituoja HEV kapsidės baltymus iš kepenų audinio lizato, todėl potencialiai šis IP metodas galėtų būti pritaikytas HEV kapsidės baltymų nustatymui infekuotose kepenyse ar kituose organuose.

3.3 Serologinių sistemų HEV nustatymui kūrimas

HEV epidemiologiniams tyrimams įprastai taikomas imunocheminis metodas yra IFA (Abravanel et al., 2013; Norder et al., 2016b; Q. Zhang et al., 2020). Nors dėl savo aukšto jautrumo PGR metodas taip pat yra taikomas HEV paplitimo tyrimuose, serologinės sistemos suteikia papildomos informacijos apie paciento imuninį atsaką į HEV infekciją (Iqbal et al., 2023). Be to, IgG antikūnų nustatymo serologinėmis sistemomis yra identifikuojamos praeities infekcijos, kas leidžia atlikti epidemiologinius tyrimus. IFA metodu iš kraujo serumo mėginio gali būti nustatomi IgM arba IgG antikūnai bei HEV kapsidės baltymas (Q. Zhang et al., 2020). Skirtingų gamintojų siūlomi komerciniai rinkiniai nustato HEV infekciją, tačiau neparodo, kokios rūšies virusas ją sukėlė. IFA metodas nustatantis tam tikrai HEV rūšiai specifiskus antikūnus potencialiai galėtų būti vertingas atliekant epidemiologinius tyrimus. Europoje labiausiai paplitęs zoonotinis HEV genotipas yra HEV-3 (Kamar et al., 2017b), tuo tarpu žiurkių HEV infekcijos atvejų pastaraisiais metais padaugėjo (Andonov et al., 2019; Rivero-Juarez et al., 2022; Sridhar et al., 2018b). Žiurkių HEV infekcija žmonėse dažniausiai sukelia sunkesnius ūmaus hepatito E simptomus, lyginant su HEV-3 infekcija, bei yra ypač pavojinga pacientams su nusilpusia

imunine sistema (Andonov et al., 2019; Reuter et al., 2020). Nors žmonėse žiurkių HEV infekcijos yra retos, šis virusas yra laikomas žmogui pavojingu patogenu. IFA metodas, kuris leistų nustatyti žiurkių HEV specifiskus antikūnus, suteiktų galimybę tiksliau vertinti šio viruso paplitimą žmonių ir laukinių gyvūnų populiacijoje.

Antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymui skirto IFA metodo kūrimui buvo pritaikytas netiesioginės IFA formatas (19 pav.). Metode buvo naudojami mielėse susintetinti rekombinantiniai HEV kapsidės baltymai – pilno ilgio (1-660 aminorūgštys) HEV-3 baltymas ir pilno ilgio (1-645 aminorūgštys) bei sutrumpintas (112-608 aminorūgštys) žiurkių HEV baltymas. Siekiant mėginyje nustatyti žiurkių HEV baltymui specifiskus antikūnus buvo pasirinkta kryžmiškai specifiskų antikūnų užblokovimo HEV-3 baltymu strategija (19 pav.). Inkubuojant kraujo mėginius HEV-3 baltymo tirpale yra užblokuojami antikūnai specifiski HEV-3 baltymui ir bendriems abiejų kapsidės baltymų epitopams (19 pav. A). Teoriškai, po inkubacijos su HEV-3 baltymu, mėginyje turėtų likti tik žiurkių HEV baltymo epitopams

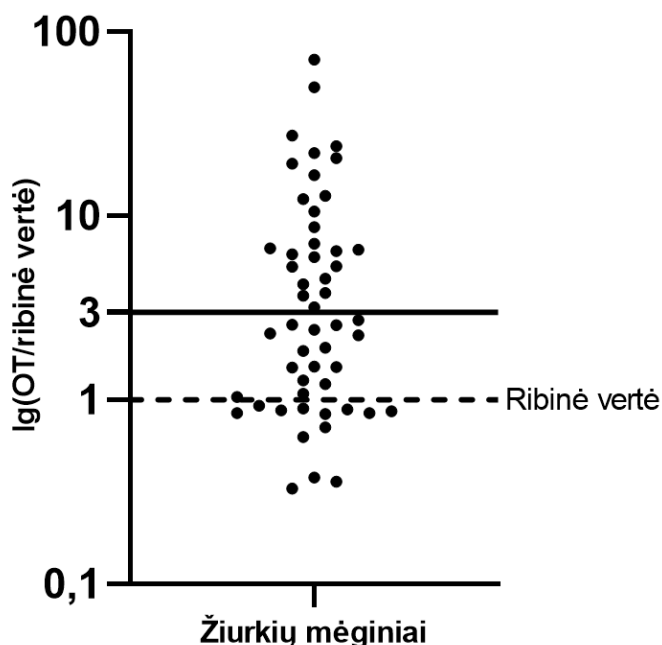


19 pav. IFA metodo žiurkių HEV baltymui specifiskų antikūnų nustatymui schema. Žalia spalva žymimi HEV-3 baltymui specifiski ir kryžmiškai specifiski antikūnai. Geltona spalva žymimi žiurkių HEV baltymui specifiski ir kryžmiškai specifiski antikūnai. Raudona spalva žymimi tik žiurkių HEV baltymui specifiski antikūnai. Sukurta naudojant *Biorender.com*.

specifiški antikūnai. Inkubuojant mėginius sutrumpinto (112-645 aminorūgštys) žiurkių HEV baltymo tirpale yra užblokuojami antikūnai specifiški žiurkių HEV baltymui ir bendriems abiejų kapsidės baltymų epitopams (19 pav. B). Teoriškai, po inkubacijos su žiurkių HEV baltymu, mėginyje turėtų likti tik HEV-3 baltymo epitopams specifiški antikūnai. Maksimalaus OT signalo nustatymui ir rezultatų analizei taip pat svarbu ištirti tuos pačius mėginius, kurie nebuvo inkubuoti su kapsidės baltymais (19 pav. C). 96 šulinėlių plokštelėje sorbuojamas sutrumpintas (112-608 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymas. Preinkubuoti (19 pav. A, B) ir nepreinkubuoti (19 pav. C) mėginiai inkubuojami su imobilizuotu žiurkių HEV baltymu. Antriniai antikūnai su fermentine žyme (HRP) prisijungia prie pirminių antikūnų, o pridėjus fermento substrato (TMB) yra stebimas spalvos pokytis, kurio skaitinė vertė (OT) išmatuojama spektrofotometriškai.

3.3.1 IFA metodo taikymas antikūnų nustatymui laukinių žiurkių mėginiuose

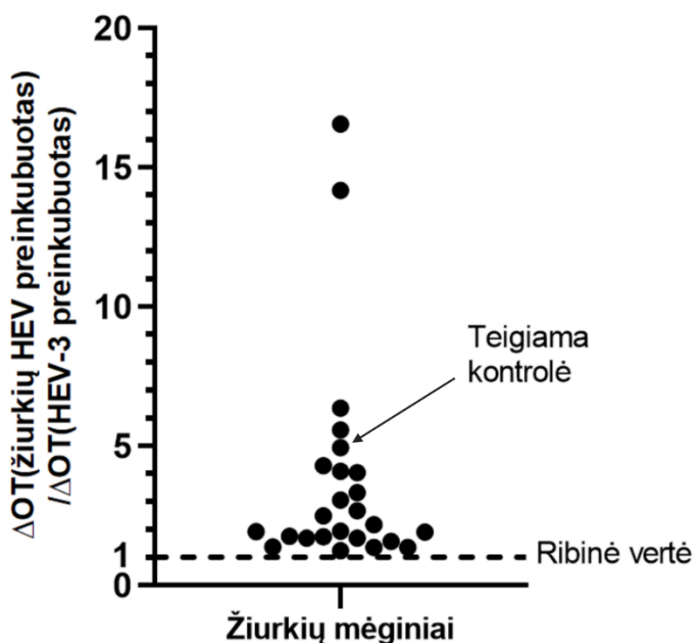
Laukinės žiurkės (*Rattus rattus*, *R. norvegicus*) yra natūralus žiurkių HEV rezervuaras (Sridhar et al., 2018b). Tyrimai rodo, kad tiek Lietuvoje (Simanavicius et al., 2018), tiek kitose Europos šalyse (Ryll et al., 2017b) laukinėse žiurkėse yra nustatoma žiurkių HEV RNR. Mūsų IFA metodas antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymui buvo išbandytas testuojant laukinių žiurkių krūtinės ertmės skysčio (CCF) mėginius. Visų pirma, 50 žiurkių CCF mėginių buvo testuojami netiesiogine IFA be preinkubacijos, siekiant identifikuoti teigiamus CCF mėginius (20 pav.). Ištyrus 50 CCF mėginių buvo atrinkti 24 mėginiai, kurių $\lg(\text{OT}/\text{ribinė vertė})$ viršijo 3 (20 pav. vientisa linija). Toks slenkstis pasirinktas siekiant ištirti mėginius, kurių signalas ženkliai viršija ribinę vertę. Naudojant aukšto ir eliminuojant žemo



20 pav. Laukinių žiurkių mėginių testavimas netiesiogine IFA. Teigiamai kontrolei naudoti rekombinantiniu žiurkių HEV kapsidės baltymu imunizuotos žiurkės PAK.

santykinio signalo mėginius buvo siekiama pademonstruoti metodo veikimą. Eksperimentuose su preinkubacija naudojant mėginius, kurių $\lg(\text{OT}/\text{ribinė vertė})$ yra mažesnė nei 3, galimi nepatikimi rezultatai, kadangi užblokavus HEV-3 baltymui specifiskus ir kryžmiškai specifiskus antikūnus santykinis signalas bus labai mažas ir neparodys kurie antikūnai mėginyje dominuoja – specifiški žiurkių HEV ar specifiški HEV-3 baltymui ir kryžmiškai specifiški. Taip pat rezultatai rodo, kad 15 mėginių $\lg(\text{OT}/\text{ribinė vertė})$ yra tarp ribinės vertės (1) ir pasirinkto slėksčio (3) (20 pav.). Siekiant gauti didesnę skirtumą tarp ribinės vertės ir teigiamų mėginių reikėtų tobulinti šį metodą, pavyzdžiui, išbandyti skirtingas antrinių antikūnų koncentracijas ar naudoti kitus antrinius antikūnus.

24 teigiami laukinių žiurkių mėginiai buvo toliau testuojami IFA antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymui. Kiekvienas CCF mėginys buvo inkubuojamas su pilno ilgio (1-660 aminorūgštys) HEV-3 baltymu bei su pilno ilgio (1-645 aminorūgštys) žiurkių HEV baltymu. Atlikus eksperimentą kiekvienam mėginiui buvo apskaičiuotas žiurkių HEV preinkubuoto OT pokyčio ir HEV-3 preinkubuoto OT pokyčio santykis. Jeigu santykio vertė yra didesnė nei 1, mėginyje yra žiurkių HEV baltymui specifiskų antikūnų. Jeigu santykio vertė mažesnė arba lygi 1, mėginyje žiurkių HEV baltymui specifiskų antikūnų nenustatyta.

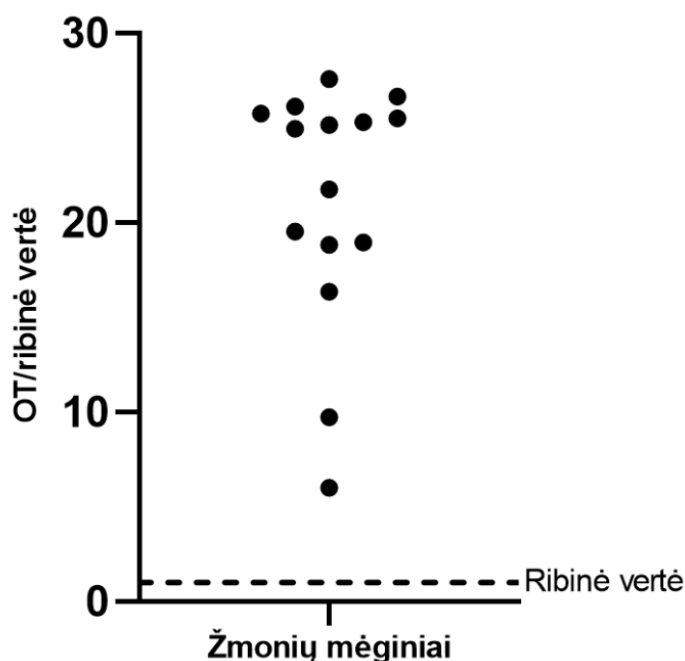


21 pav. Laukinių žiurkių mėginių testavimas antikūnų specifiskų žiurkių HEV nustatymui. Teigiamai kontrolei naudoti žiurkių HEV imunizuotos žiurkės PAK.

Ištyrus 24 laukinių žiurkių mėginius buvo pastebėta, kad žiurkių HEV preinkubuoto OT pokyčio ir HEV-3 preinkubuoto OT pokyčio santykis viršija 1 visuose mėginiuose (21 pav.). Tai rodo, kad visuose ištirtuose žiurkių CCF mėginiuose yra antikūnų specifiskų žiurkių HEV kapsidės baltymui. Taip pat tyrimo rezultatai rodo, kad ΔOT (žiurkių HEV preinkubuotas) ir ΔOT (HEV-3 preinkubuotas) santykiai labai varijuoja tarp mėginių. Dvylikos mėginių ΔOT (žiurkių HEV preinkubuotas) viršija ΔOT (HEV-3 preinkubuotas) tik iki 2 kartų (21 pav.). Tuo tarpu dviejų žiurkių serumų ΔOT (žiurkių HEV preinkubuotas) viršijo ΔOT (HEV-3 preinkubuotas) net 14-16 kartų (21 pav.). Tokią variaciją gali lemti skirtingi veiksniai, tokie kaip žiurkės antikūnų prieš HEV koncentracija mėginyje ir afiniškumas HEV kapsidės baltymams, antrinių antikūnų afiniškumas tiriamiems žiurkės antikūnams. Apibendrinant, šis eksperimentas parodė, kad IFA metodas žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymui veikia ir potencialiai galėtų būti pritaikytas žiurkių epidemiologiniams tyrimams.

3.3.2 IFA metodo taikymas antikūnų nustatymui žmonių mėginiuose

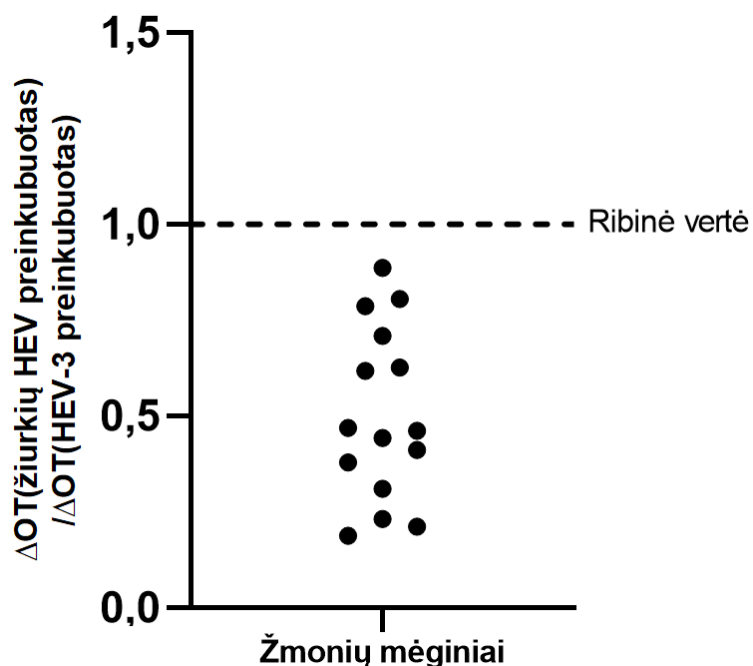
IFA metodą antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymui buvo siekiama išbandyti tiriant žmonių kraujo serumo mėginius. Eksperimentams buvo naudota penkiolika HEV teigiamų žmonių kraujo serumo mėginių, kurie yra apibūdinti komerciniais rinkiniais antikūnų prieš HEV nustatymui (Simanavicius, 2021). Pirmiausia buvo siekiama nustatyti, ar serumo mėginiuose esantys antikūnai prieš HEV reaguoja su sutrumpintu (112-608 aminorūgštys) žiurkių HEV baltymu. Kiekvienas serumo mėginys buvo inkubuojamas su plokštelėje imobilizuotu žiurkių HEV baltymu. Ištyrus žmonių kraujo serumo mėginius



22 pav. Žmonių kraujo serumo mėginių testavimas netiesiogine IFA.

buvo nustatyta, kad visi 15 mėginių sąveikauja su sutrumpintu žiurkių HEV kapsidės baltymu (22 pav.). Toliau šie mėginiai buvo tiriami IFA antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymui. Atlikus eksperimentą kiekvienam mėginiui buvo apskaičiuotas $\Delta OT(\text{žiurkių HEV preinkubuotas})$ ir $\Delta OT(\text{HEV-3 preinkubuotas})$ santykis.

Atlikus eksperimentą buvo nustatyta, kad visų penkiolikos žmonių mėginių $\Delta OT(\text{žiurkių HEV preinkubuotas})$ ir $\Delta OT(\text{HEV-3 preinkubuotas})$ santykis yra mažesnis negu 1 (23 pav.). Tai reiškia, kad ištirtuose serumo mėginiuose antikūnų specifinių žiurkių HEV baltymui nenustatyta. Didesnis ΔOT užfiksuotas po serumo mėginių preinkubacijos su HEV-3 baltymu, negu po preinkubacijos su žiurkių HEV baltymu. Remiantis tuo galima kelti hipotezę, kad mėginiuose dominuoja HEV-3 baltymui ir kryžmiškai specifiniai antikūnai.



23 pav. Žmonių mėginių testavimas antikūnų specifinių žiurkių HEV nustatymui.

Mūsų IFA metodu buvo ištirti 24 HEV teigiami žiurkių CCF mėginiai ir 15 HEV teigiamų žmonių mėginių. Pagal šį testą visuose žiurkių mėginiuose buvo nustatyti antikūnai specifiniai žiurkių HEV kapsidės baltymui, tuo tarpu žmonių mėginiuose antikūnų prieš žiurkių HEV nenustatyta. Svarbu yra tai, kad šis metodas leidžia nustatyti žiurkių HEV specifinius antikūnus eliminuojant antikūnus, kryžmiškai specifinius HEV-3, kuris yra labiausiai Europoje paplitęs HEV genotipas (Kamar et al., 2017b). Toks IFA metodas teikia naujas perspektyvas epidemiologiniams tyrimams, kadangi juo galima tiksliau tirti žiurkių HEV paplitimą laukinių gyvūnų bei žmonių populiacijoje.

IŠVADOS

1. Ląstelių stabilumo patikra yra labai svarbi, kadangi keturių iš dvylikos šiame darbe naudotų hibridomų linijų reklonai pasižymėjo nestabilia MAk specifiskų HEV kapsidės baltymams sekrecija, todėl ląstelės buvo stabilizuotos reklonuojant. Visi 12 išgrynintų MAk reaguoja su rekombinantiniams HEV kapsidės baltymais.
2. Sukurtas IP metodas geba nustatyti rekombinantinius HEV kapsidės baltymus HEK293 ląstelių lizate, šernų ir žiurkių kepenų audinio lizatuose. MAk CPB11 ir CPH7 pasižymi dideliu specifiskumu rekombinantiniams HEV kapsidės baltymams, nes heterogeniškame mišinyje nustato atitinkamai 0,05 µg HEV-3 bei 0,4 µg žiurkių HEV baltymo.
3. Sukurtas konkurencinės IFA metodas, kuriame blokuojami kryžmiškai HEV-3 kapsidės baltymui specifiski antikūnai leidžia detektuoti žiurkių HEV specifiskus antikūnus žmonių kraujo serumo ir žiurkių CCF mėginiuose.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Olgerd Babkin

Magistro baigiamasis darbas

Zoonotinio hepatito E viruso nustatymo metodų kūrimas

SANTRAUKA

Naminės kiaulės, šernai, žiurkės ir kiti gyvūnai yra natūralus zoonotinio hepatito E viruso (HEV) rezervuaras. HEV gali infekuoti žmones per prastai termiškai apdorotą mėsą, užterštą vandenį ar tiesioginį kontaktą su gyvūnais. Nors didžioji dalis infekcijų yra besimptomės, zoonotinis HEV gali sukelti ūmų hepatitą E, chronišką hepatitą E pacientuose su nusilpusia ar nuslopinta imunine sistema ir įvairias komplikacijas nėštumo metu ar po organų transplantacijos. Europoje labiausiai paplitęs zoonotinis HEV genotipas yra HEV-3, tuo tarpu žiurkių HEV infekcijos atvejų pastaraisiais metais padaugėjo. HEV epidemiologinių tyrimų svarba vis didėja, todėl atsiranda poreikis kurti naujus imunocheminius metodus, leidžiančius aptikti HEV antigeną ar jam specifiskus antikūnus.

Šio magistro darbo tikslas – sukurti imunocheminius metodus zoonotinių HEV nustatymui žmonių ir laukinių gyvūnų mėginiuose. Darbo uždaviniai: išgryninti monokloninius antikūnus (MAk) prieš HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus; sukurti imunoprecipitacijos (IP) metodą HEV kapsidės baltymų nustatymui laukinių gyvūnų kepenų mėginiuose; sukurti serologinį metodą žiurkių HEV specifiskų antikūnų nustatymui ir ištirti žmonių ir žiurkių kraujo mėginius.

Iš hibridomų augimo terpių buvo išgryninti 4 MAk specifiški HEV-3 kapsidės baltymui, 5 MAk specifiški žiurkių HEV kapsidės baltymui ir 3 MAk specifiški abiejų viruso genotipų kapsidės baltymams. Visi MAk buvo pritaikyti rekombinantinių HEV kapsidės baltymų IP metodo optimizavime. Atliekant IP optimizavimo eksperimentus sukurtas veiksmingas plovimo tirpalas (TBS su 0,1 % SDS ir 2 mM DTT), kuris pašalina didžiąją dalį nespecifinių sąveikų tarp HEV kapsidės baltymų ir sefarozės dalelių. IP naudojant MAk CPB11 šernų kepenų lizate yra detektuojama 0,05 µg HEV-3 baltymo. IP naudojant MAk CPH7 žiurkių kepenų lizate detektuojama 0,4 µg žiurkių HEV baltymo. Rekombinantiniu HEV-3 baltymu blokuojant HEV-3 specifiskus ir kryžmiškai specifiskus antikūnus yra nustatomi žiurkių HEV specifiški antikūnai žmonių kraujo serumo ir žiurkių CCF mėginiuose. Ištyrus 50 laukinių žiurkių CCF mėginius žiurkių HEV specifiški antikūnai nustatyti 24 mėginiuose (48 %). Ištyrus 15 HEV teigiamų žmonių kraujo serumo mėginių žiurkių HEV specifiški antikūnai nebuvo nustatyti nei viename iš mėginių.

Olgerd Babkin

Master's Thesis

Development of Methods for the Detection of Zoonotic Hepatitis E Virus

ABSTRACT

Domestic pigs, wild boars, rats, and other animals serve as natural reservoirs for the zoonotic hepatitis E virus (HEV). HEV can infect humans through the consumption of inadequately cooked meat, contaminated water, or direct contact with infected animals. Although most infections are asymptomatic, zoonotic HEV may cause acute hepatitis E, chronic hepatitis E in immunocompromised or immunosuppressed patients, and serious complications during pregnancy or after solid organ transplantation. In Europe, the predominant zoonotic genotype is HEV-3, while reports of rat HEV infections have risen in recent years. As the epidemiological importance of HEV continues to grow, there is an increasing need for new immunochemical methods capable of detecting HEV antigens or virus-specific antibodies.

The aim of this master's thesis is to develop immunochemical methods for identifying zoonotic HEV in human and wild-animal samples. The specific objectives are: to purify monoclonal antibodies (mAbs) directed against the capsid proteins of HEV-3 and rat HEV; to establish an immunoprecipitation (IP) assay for detecting HEV capsid proteins in wild-animal liver samples; to create a serological test for rat HEV-specific antibodies and to examine human and rat blood specimens.

Four mAbs specific to HEV-3, five mAbs specific to rat HEV, and three cross-reactive mAbs were purified from hybridoma growth medium. All of the mAbs were used in optimizing the immunoprecipitation method for recombinant HEV capsid proteins. During optimization, an effective wash buffer (TBS containing 0.1 % SDS and 2 mM DTT) was developed that eliminated most nonspecific interactions between HEV capsid proteins and Sepharose beads. With mAb CPB11, as little as 0.05 µg of HEV-3 protein could be detected in wild-boar liver lysate, while mAb CPH7 allowed detection of 0.4 µg of rat HEV protein in rat liver lysate. By blocking HEV-3-specific and cross-reactive antibodies with recombinant HEV-3 protein, rat HEV-specific antibodies were identified in human serum and rat CCF samples. Among 50 wild-rat CCF samples, rat HEV-specific antibodies were found in 24 (48 %), whereas none were detected in 15 HEV-positive human serum samples.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Martynui Simanavičiui už pagalbą, vertingus patarimus, kantrybę ir pasitikėjimą rengiant baigiamąjį darbą. Taip pat dėkoju už palaikymą sunkiausiais darbo rengimo etapais ir už tai, kad išmokau savarankiškai planuoti ir atlikti eksperimentus.

Dėkoju profesorei Aurelijai Žvirblienei už suteiktą galimybę atlikti baigiamąjį darbą Imunologijos skyriuje bei už įgytas imunologijos srities teorines žinias.

Taip pat norėčiau padėkoti laboratorijos kolegoms Agnei Rimkutei, Dainiui Gudui, Indrei Dalgėdienei, dr. Indrei Kučinskaitei-Kodzei, Tomui Vainauskui ir Dianai Ulčic už įdomias diskusijas ir pagalbą sprendžiant darbo laboratorijoje metu iškilusias problemas.

LITERATŪROS ŠARŠAS

1. Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Lhomme, S., Miedougé, M., Peron, J.-M., Alric, L., Rostaing, L., Kamar, N., & Izopet, J. (2013). Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Virology*, 58(4), 624–628. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.003>
2. Abravanel, F., Lhomme, S., Costa, H. E., Schvartz, B., Peron, J.-M., Kamar, N., & Izopet, J. (2017). *Rabbit Hepatitis E Virus Infections in Humans, France—Volume 23, Number 7—July 2017—Emerging Infectious Diseases journal—CDC*. <https://doi.org/10.3201/eid2307.170318>
3. Abravanel, F., Pique, J., Couturier, E., Nicot, F., Dimeglio, C., Lhomme, S., Chiabrand, J., Saune, K., Péron, J.-M., Kamar, N., Evrard, S., de Valk, H., Cintas, P., & Izopet, J. (2018). Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations. *Journal of Infection*, 77(3), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.007>
4. Aggarwal, R., & Goel, A. (2021). Hepatitis E: Current Status in India. *Clinical Liver Disease*, 18(3), 168–172. <https://doi.org/10.1002/cld.1146>
5. Andonov, A., Robbins, M., Borlang, J., Cao, J., Hatchette, T., Stueck, A., Deschambault, Y., Murnaghan, K., Varga, J., & Johnston, L. (2019). Rat Hepatitis E Virus Linked to Severe Acute Hepatitis in an Immunocompetent Patient. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(6), 951–955. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz025>
6. Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., & Poleschuk, V. F. (2008). Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *Intervirology*, 20(1), 23–31. <https://doi.org/10.1159/000149370>
7. Bányai, K., Tóth, Á. G., Ivanics, É., Glávits, R., Szentpáli-Gavallér, K., & Dán, Á. (2012). Putative Novel Genotype of Avian Hepatitis E Virus, Hungary, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), 1365–1368. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111669>
8. Batts, W., Yun, S., Hedrick, R., & Winton, J. (2011). A novel member of the family *Hepeviridae* from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Research*, 158(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.019>
9. Bauer, H., Luxembourger, C., Gottenberg, J.-E., Fournier, S., Abravanel, F., Cantagrel, A., Chatelus, E., Claudepierre, P., Hudry, C., Izopet, J., Fabre, S., Lefevre, G., Marguerie, L., Martin, A., Messer, L., Molto, A., Pallot-Prades, B., Pers, Y.-M., Roque-Afonso, A.-M., ... Club Rhumatismes et Inflammation, a section of the French Society of Rheumatology. (2015). Outcome of hepatitis E virus infection in patients with inflammatory arthritides treated with immunosuppressants: A French retrospective multicenter study. *Medicine*, 94(14), e675. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000675>
10. Bilic, I., Jaskulska, B., Basic, A., Morrow, C. J., & Hess, M. (2009). Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *Journal of General Virology*, 90(4), 863–873. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007179-0>
11. Clemente-Casares, P., Ramos-Romero, C., Ramirez-Gonzalez, E., & Mas, A. (2016). Hepatitis E Virus in Industrialized Countries: The Silent Threat. *BioMed Research International*, 2016(1), 9838041. <https://doi.org/10.1155/2016/9838041>
12. Dalton, H. R., & Izopet, J. (2018). Transmission and Epidemiology of Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infections. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(11), a032144. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032144>
13. Dalton, H. R., Kamar, N., Baylis, S. A., Moradpour, D., Wedemeyer, H., & Negro, F. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *Journal of Hepatology*, 68(6), 1256–1271. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>

14. Dalton, H. R., Kamar, N., van Eijk, J. J. J., Mclean, B. N., Cintas, P., Bendall, R. P., & Jacobs, B. C. (2016). Hepatitis E virus and neurological injury. *Nature Reviews Neurology*, 12(2), 77–85. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.234>
15. Dalton, H. R., van Eijk, J. J. J., Cintas, P., Madden, R. G., Jones, C., Webb, G. W., Norton, B., Pique, J., Lutgens, S., Devooght-Johnson, N., Woolson, K., Baker, J., Saunders, M., Househam, L., Griffiths, J., Abravanel, F., Izopet, J., Kamar, N., van Alfen, N., ... Jacobs, B. C. (2017). Hepatitis E virus infection and acute non-traumatic neurological injury: A prospective multicentre study. *Journal of Hepatology*, 67(5), 925–932. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.07.010>
16. Deniel, C., Coton, T., Brardjanian, S., Guisset, M., Nicand, E., & Simon, F. (2011). Acute pancreatitis: A rare complication of acute hepatitis E. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 51(3), 202–204. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.04.009>
17. Di Martino, B., Di Profio, F., Melegari, I., Sarchese, V., Robetto, S., Marsilio, F., & Martella, V. (2016). Detection of hepatitis E virus (HEV) in goats. *Virus Research*, 225, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.09.008>
18. Ding, Q., Heller, B., Capuccino, J. M. V., Song, B., Nimgaonkar, I., Hrebikova, G., Contreras, J. E., & Ploss, A. (2017). Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5), 1147–1152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614955114>
19. Ditah, I., Ditah, F., Devaki, P., Ditah, C., Kamath, P. S., & Charlton, M. (2014). Current epidemiology of hepatitis E virus infection in the United States: Low seroprevalence in the National Health and Nutrition Evaluation Survey. *Hepatology*, 60(3), 815–822. <https://doi.org/10.1002/hep.27219>
20. Drexler, J. F., Seelen, A., Corman, V. M., Tateno, A. F., Cottontail, V., Zerbinati, R. M., Gloza-Rausch, F., Klose, S. M., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S. K., Kalko, E. K. V., Osterman, A., Rasche, A., Adam, A., Müller, M. A., Ulrich, R. G., Leroy, E. M., Lukashev, A. N., & Drosten, C. (2012). Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00800-12>
21. Faber, M., Willrich, N., Schemmerer, M., Rauh, C., Kuhnert, R., Stark, K., & Wenzel, J. J. (2018). Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *Journal of Viral Hepatitis*, 25(6), 752–758. <https://doi.org/10.1111/jvh.12868>
22. Fukae, J., Tsugawa, J., Ouma, S., Umezu, T., Kusunoki, S., & Tsuboi, Y. (2016). Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes in patients with anti-hepatitis E virus antibody: A hospital-based survey in Japan. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 37(11), 1849–1851. <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2644-4>
23. Geng, Y., Zhang, H., Huang, W., J Harrison, T., Geng, K., Li, Z., & Wang, Y. (2014). Persistent Hepatitis E Virus Genotype 4 Infection in a Child With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hepatitis Monthly*, 14(1), e15618. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.15618>
24. Gérolami, R., Moal, V., & Colson, P. (2008a). Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *The New England Journal of Medicine*, 358(8), 859–860. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0708687>
25. Gérolami, R., Moal, V., & Colson, P. (2008b). Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *The New England Journal of Medicine*, 358(8), 859–860. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0708687>
26. Geurtsvankessel, C. H., Islam, Z., Mohammad, Q. D., Jacobs, B. C., Endtz, H. P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2013). Hepatitis E and Guillain-Barre syndrome. *Clinical Infectious Diseases: An Official*

Publication of the Infectious Diseases Society of America, 57(9), 1369–1370.

<https://doi.org/10.1093/cid/cit512>

27. Gr, R. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, 247, 1335–1339.
28. Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., & Emerson, S. U. (2006). A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus. *Journal of Virology*, 80(12), 5919–5926. <https://doi.org/10.1128/jvi.00046-06>
29. Grigas, J., Montoya, M., Simkute, E., Buitkus, M., Zagrabskaite, R., Pautienius, A., Razukevicius, D., Jonaitis, L. V., Kiudelis, G., Skieceviciene, J., Vaiciuniene, R., Stankuviene, A., Bumblyte, I. A., Kupcinskas, J., & Stankevicius, A. (2021). Molecular Characterization and Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Inflammatory Bowel Disease Patients and Solid Organ Transplant Recipients. *Viruses*, 13(4), 670. <https://doi.org/10.3390/v13040670>
30. Guthmann, J.-P., Klovstad, H., Boccia, D., Hamid, N., Pinoges, L., Nizou, J.-Y., Tatay, M., Diaz, F., Moren, A., Grais, R. F., Ciglenecki, I., Nicand, E., & Guerin, P. J. (2006). A Large Outbreak of Hepatitis E among a Displaced Population in Darfur, Sudan, 2004: The Role of Water Treatment Methods. *Clinical Infectious Diseases*, 42(12), 1685–1691. <https://doi.org/10.1086/504321>
31. Haagsma, E. B., van den Berg, A. P., Porte, R. J., Benne, C. A., Vennema, H., Reimerink, J. H. J., & Koopmans, M. P. G. (2008). Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 14(4), 547–553. <https://doi.org/10.1002/lt.21480>
32. Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H., & Meng, X. J. (2001). Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis–splenomegaly syndrome in the United States. *Journal of General Virology*, 82(10), 2449–2462. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2449>
33. Holla, P., Ahmad, I., Ahmed, Z., & Jameel, S. (2015). Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 16(4), 398–416. <https://doi.org/10.1111/tra.12260>
34. Hooda, P., Chaudhary, M., Parvez, M. K., Sinha, N., & Sehgal, D. (2022). Inhibition of Hepatitis E Virus Replication by Novel Inhibitor Targeting Methyltransferase. *Viruses*, 14(8), 1778. <https://doi.org/10.3390/v14081778>
35. Horvatits, T., Schulze zur Wiesch, J., Polywka, S., Buescher, G., Lütgehetmann, M., Hussey, E., Horvatits, K., Peine, S., Haag, F., Addo, M. M., Lohse, A. W., Weiler-Normann, C., & Pischke, S. (2020). Significance of Anti-Nuclear Antibodies and Cryoglobulins in Patients with Acute and Chronic HEV Infection. *Pathogens*, 9(9), 755. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090755>
36. Hyams, C., Mabayoje, D. A., Copping, R., Maranao, D., Patel, M., Labbett, W., Haque, T., & Webster, D. P. (2014). Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *Journal of Medical Virology*, 86(3), 478–483. <https://doi.org/10.1002/jmv.23827>
37. Iqbal, H., Mehmood, B. F., Sohal, A., & Roytman, M. (2023). Hepatitis E infection: A review. *World Journal of Virology*, 12(5), 262–271. <https://doi.org/10.5501/wjv.v12.i5.262>
38. Iza, M., Ramos, D., Llauroadó, A., Restrepo-Vera, J. L., Pallero, M., Granados, G., Alemany, J., Sotoca, J., Sampol, J., Martí, S., Sanchez-Tejerina, D., Salvadó, M., & Juntas, R. (2025). Neurological Manifestations of HEV Infection: A Rare Phenomenon or an Underrecognized Reality? *Brain and Behavior*, 15(6), e70585. <https://doi.org/10.1002/brb3.70585>
39. Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandeau, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., & Guérin, J.-L. (2012). Hepatitis E Virus Strains in Rabbits and Evidence of a Closely Related Strain in Humans, France. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), 1274–1281. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120057>

40. Jha, A. K., Kumar, G., Dayal, V. M., Ranjan, A., & Suchismita, A. (2021). Neurological manifestations of hepatitis E virus infection: An overview. *World Journal of Gastroenterology*, 27(18), 2090–2104. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i18.2090>
41. Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S. A., Sehgal, D., & Jameel, S. (2009). Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *Journal of Virology*, 83(24), 12714–12724. <https://doi.org/10.1128/JVI.00717-09>
42. Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., & Dalton, H. R. (2017a). Hepatitis E virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17086. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86>
43. Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., & Dalton, H. R. (2017b). Hepatitis E virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17086. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86>
44. Kamar, N., Mansuy, J. M., Esposito, L., Legrand-Abravanel, F., Peron, J. M., Durand, D., Rostaing, L., & Izopet, J. (2005). Acute hepatitis and renal function impairment related to infection by hepatitis E virus in a renal allograft recipient. *American Journal of Kidney Diseases*, 45(1), 193–196. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.09.006>
45. Kamar, N., Rostaing, L., Legrand-Abravanel, F., & Izopet, J. (2013). How Should Hepatitis E Virus Infection Be Defined in Organ-Transplant Recipients? *American Journal of Transplantation*, 13(7), 1935–1936. <https://doi.org/10.1111/ajt.12253>
46. Karpe, Y. A., & Lole, K. S. (2010). NTPase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *Journal of Virology*, 84(7), 3595–3602. <https://doi.org/10.1128/JVI.02130-09>
47. Karpe, Y. A., & Lole, K. S. (2011). Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 9), 2088–2092. <https://doi.org/10.1099/vir.0.033738-0>
48. Kenfak-Foguena, A., Schöni-Affolter, F., Bürgisser, P., Witteck, A., Darling, K. E. A., Kovari, H., Kaiser, L., Evison, J.-M., Elzi, L., De La Fuente, V. G., Jost, J., Moradpour, D., Abravanel, F., Izopet, J., & Cavassini, M. (2011). Hepatitis E Virus Seroprevalence and Chronic Infections in Patients with HIV, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), 1074–1078. <https://doi.org/10.3201/eid1706.101067>
49. Khuroo, M. S., Kamili, S., & Khuroo, M. S. (2009). Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *Journal of Viral Hepatitis*, 16(7), 519–523. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01101.x>
50. Khuroo, M. S., Khuroo, M. S., & Khuroo, N. S. (2016). Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World Journal of Gastroenterology*, 22(31), 7030–7045. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7030>
51. Kraef, C., Schlein, C., Hiller, J., Westhölter, D., Denzer, U., Horvatits, T., Peine, S., Lohse, A. W., Lütgehetmann, M., Polywka, S., & Pischke, S. (2018). Course of HEV viremia and anti-HEV IgM/IgG response in asymptomatic blood donors. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 105, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.013>
52. Lee, G.-H., Tan, B.-H., Chi-Yuan Teo, E., Lim, S.-G., Dan, Y.-Y., Wee, A., Kim Aw, P. P., Zhu, Y., Hibberd, M. L., Tan, C.-K., Purdy, M. A., & Teo, C.-G. (2016a). Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, 150(2), 355–357.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048>
53. Lee, G.-H., Tan, B.-H., Chi-Yuan Teo, E., Lim, S.-G., Dan, Y.-Y., Wee, A., Kim Aw, P. P., Zhu, Y., Hibberd, M. L., Tan, C.-K., Purdy, M. A., & Teo, C.-G. (2016b). Chronic Infection With

- Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, 150(2), 355-357.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048>
54. McCarthy, M. C., He, J., Hyams, K. C., El-Tigani, A., & Khalid, I. O. (1994). *Acute Hepatitis E Infection During the 1988 Floods in Khartoum, Sudan* (No. NMRI9415). Article NMRI9415. <https://apps.dtic.mil/sti/html/tr/ADA280267/>
 55. Meng, X.-J. (2013). Zoonotic and Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus. *Seminars in Liver Disease*, 33(01), 041–049. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338113>
 56. Meng, X.-J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J., & Emerson, S. U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18), 9860–9865. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9860>
 57. Miyamura, T. (2011). Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus Research*, 161(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.006>
 58. Nagashima, S., Takahashi, M., Kobayashi, T., Tanggis, Nishizawa, T., Nishiyama, T., Primadharsini, P. P., & Okamoto, H. (2017). Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *Journal of Virology*, 91(22), 10.1128/jvi.00822-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00822-17>
 59. Navaneethan, U., Al Mohajer, M., & Shata, M. T. (2008). Hepatitis E and pregnancy: Understanding the pathogenesis. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 28(9), 1190–1199. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x>
 60. Norder, H., Karlsson, M., Mellgren, Å., Konar, J., Sandberg, E., Lason, A., Castedal, M., Magnus, L., & Lagging, M. (2016a). Diagnostic Performance of Five Assays for Anti-Hepatitis E Virus IgG and IgM in a Large Cohort Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 549–555. <https://doi.org/10.1128/jcm.02343-15>
 61. Norder, H., Karlsson, M., Mellgren, Å., Konar, J., Sandberg, E., Lason, A., Castedal, M., Magnus, L., & Lagging, M. (2016b). Diagnostic Performance of Five Assays for Anti-Hepatitis E Virus IgG and IgM in a Large Cohort Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 549–555. <https://doi.org/10.1128/jcm.02343-15>
 62. Oechslin, N., Da Silva, N., Szkolnicka, D., Cantrelle, F.-X., Hanouille, X., Moradpour, D., & Gouttenoire, J. (2022). Hepatitis E virus RNA-dependent RNA polymerase is involved in RNA replication and infectious particle production. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 75(1), 170–181. <https://doi.org/10.1002/hep.32100>
 63. Oechslin, N., Moradpour, D., & Gouttenoire, J. (2020). On the Host Side of the Hepatitis E Virus Life Cycle. *Cells*, 9(5), 1294. <https://doi.org/10.3390/cells9051294>
 64. Ollier, L., Tieulie, N., Sanderson, F., Heudier, P., Giordanengo, V., Fuzibet, J.-G., & Nicand, E. (2009). Chronic Hepatitis After Hepatitis E Virus Infection in a Patient With Non-Hodgkin Lymphoma Taking Rituximab. *Annals of Internal Medicine*, 150(6), 430–431. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-6-200903170-00026>
 65. Panda, S. K., Ansari, I. H., Durgapal, H., Agrawal, S., & Jameel, S. (2000). The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *Journal of Virology*, 74(5), 2430–2437. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2430-2437.2000>
 66. Pas, S. D., Streefkerk, R. H. R. A., Pronk, M., de Man, R. A., Beersma, M. F., Osterhaus, A. D. M. E., & van der Eijk, A. A. (2013). Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 58(4), 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.010>

67. Payne, C. J., Ellis, T. M., Plant, S. L., Gregory, A. R., & Wilcox, G. E. (1999). Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Veterinary Microbiology*, 68(1), 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00067-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00067-X)
68. Péron, J. M., Bureau, C., Poirson, H., Mansuy, J. M., Alric, L., Selves, J., Dupuis, E., Izopet, J., & Vinel, J. P. (2007). Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: Description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *Journal of Viral Hepatitis*, 14(5), 298–303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00858.x>
69. Péron, J.-M., Mansuy, J.-M., Récher, C., Bureau, C., Poirson, H., Alric, L., Izopet, J., & Vinel, J.-P. (2006). Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(7), 1223–1224. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04209.x>
70. Purdy, M. A., Drexler, J. F., Meng, X.-J., Norder, H., Okamoto, H., Van der Poel, W. H. M., Reuter, G., de Souza, W. M., Ulrich, R. G., & Smith, D. B. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022. *Journal of General Virology*, 103(9), 001778. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778>
71. Raj, V. S., Smits, S. L., Pas, S. D., Provacia, L. B. V., Moorman-Roest, H., Osterhaus, A. D. M. E., & Haagmans, B. L. (2012). Novel Hepatitis E Virus in Ferrets, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), 1369–1370. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111659>
72. Rein, D. B., Stevens, G. A., Theaker, J., Wittenborn, J. S., & Wiersma, S. T. (2012). The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*, 55(4), 988–997. <https://doi.org/10.1002/hep.25505>
73. Reuter, G., Boros, Á., & Pankovics, P. (2020). Review of Hepatitis E Virus in Rats: Evident Risk of Species Orthohepevirus C to Human Zoonotic Infection and Disease. *Viruses*, 12(10), 1148. <https://doi.org/10.3390/v12101148>
74. Rivero-Juarez, A., Frias, M., Perez, A. B., Pineda, J. A., Reina, G., Fuentes-Lopez, A., Freyre-Carrillo, C., Ramirez-Arellano, E., Alados, J. C., & Rivero, A. (2022). Orthohepevirus C infection as an emerging cause of acute hepatitis in Spain: First report in Europe. *Journal of Hepatology*, 77(2), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.01.028>
75. Rivero-Juarez, A., Lopez-Lopez, P., Frias, M., & Rivero, A. (2019). Hepatitis E Infection in HIV-Infected Patients. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1425. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01425>
76. Ryll, R., Bernstein, S., Heuser, E., Schlegel, M., Dremsek, P., Zumpe, M., Wolf, S., Pépin, M., Bajomi, D., Müller, G., Heiberg, A.-C., Spahr, C., Lang, J., Groschup, M. H., Ansorge, H., Freise, J., Guenther, S., Baert, K., Ruiz-Fons, F., ... Ulrich, R. G. (2017a). Detection of rat hepatitis E virus in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) and Black rats (*Rattus rattus*) from 11 European countries. *Veterinary Microbiology*, 208, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.001>
77. Ryll, R., Bernstein, S., Heuser, E., Schlegel, M., Dremsek, P., Zumpe, M., Wolf, S., Pépin, M., Bajomi, D., Müller, G., Heiberg, A.-C., Spahr, C., Lang, J., Groschup, M. H., Ansorge, H., Freise, J., Guenther, S., Baert, K., Ruiz-Fons, F., ... Ulrich, R. G. (2017b). Detection of rat hepatitis E virus in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) and Black rats (*Rattus rattus*) from 11 European countries. *Veterinary Microbiology*, 208, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.001>
78. Salvio, A. L., Lopes, A. O., Almeida, A. J., Gardinali, N. R., Lima, L. R. P., de Oliveira, J. M., Sion, F. S., Ribeiro, L. C. P., Pinto, M. A., & de Paula, V. S. (2018). Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-HEV in HIV-positive patients. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 1208–1215. <https://doi.org/10.1111/jam.14024>
79. Sayed, I. M., Seddik, M. I., Gaber, M. A., Saber, S. H., Mandour, S. A., & El-Mokhtar, M. A. (2020). Replication of Hepatitis E Virus (HEV) in Primary Human-Derived Monocytes and Macrophages In Vitro. *Vaccines*, 8(2), 239. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020239>
80. Siddell, S. G., Smith, D. B., Adriaenssens, E., Alfenas-Zerbini, P., Dutilh, B. E., Garcia, M. L., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Lefkowitz, E. J., Łobocka, M., Mushegian, A. R., Oksanen, H. M., Robertson, D. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Suzuki, N., ...

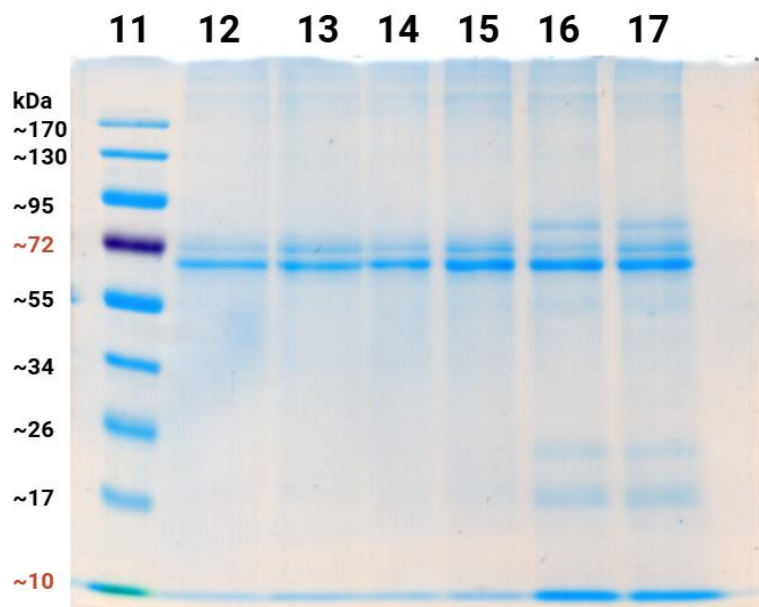
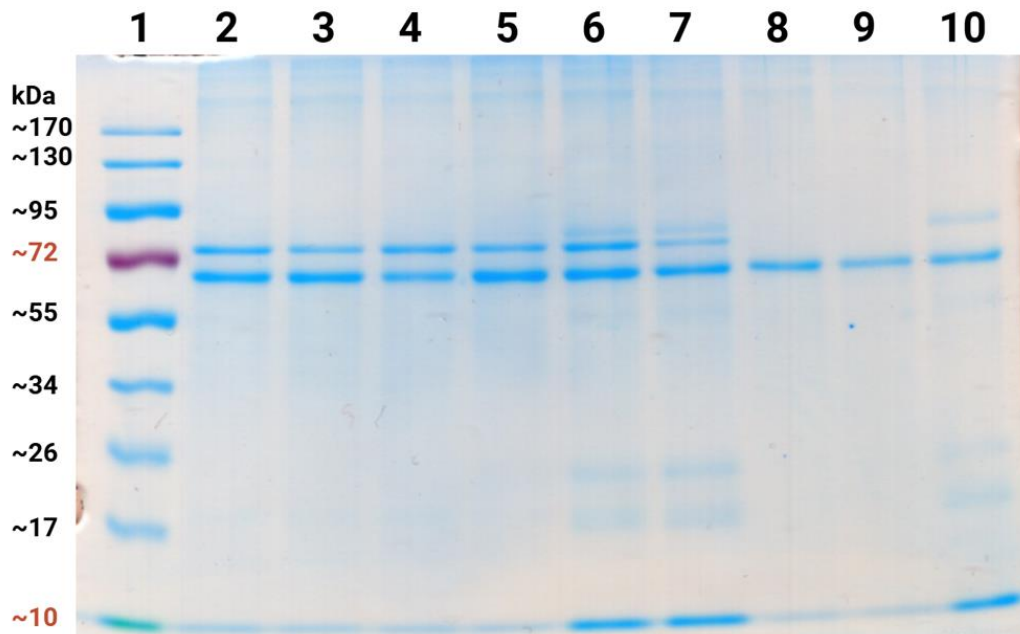
- Zerbini, F. M. (2023). Virus taxonomy and the role of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Journal of General Virology*, 104(5), 001840. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001840>
81. Simanavičius, M. (2021). *Hepatito E viruso diagnostika ir paplitimo tyrimai* [Vilnius universitetas.]. <https://doi.org/10.15388/vu.thesis.168>
82. Simanavicius, M., Juskaite, K., Verbickaite, A., Jasiulionis, M., Tamosiunas, P. L., Petraityte-Burneikiene, R., Zvirbliene, A., Ulrich, R. G., & Kucinskaite-Kodze, I. (2018). Detection of rat hepatitis E virus, but not human pathogenic hepatitis E virus genotype 1–4 infections in wild rats from Lithuania. *Veterinary Microbiology*, 221, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.014>
83. Smith, D. B., Izopet, J., Nicot, F., Simmonds, P., Jameel, S., Meng, X.-J., Norder, H., Okamoto, H., van der Poel, W. H. M., Reuter, G., & Purdy, M. A. (2020). Update: Proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *Journal of General Virology*, 101(7), 692–698. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001435>
84. Sooryanarain, H., Heffron, C. L., Hill, D. E., Fredericks, J., Rosenthal, B. M., Werre, S. R., Opriessnig, T., & Meng, X.-J. (2020). Hepatitis E Virus in Pigs from Slaughterhouses, United States, 2017–2019. *Emerging Infectious Diseases*, 26(2), 354–357. <https://doi.org/10.3201/eid2602.191348>
85. Sooryanarain, H., & Meng, X.-J. (2019). Hepatitis E virus: Reasons for emergence in humans. *Current Opinion in Virology*, 34, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.11.006>
86. Sridhar, S., Yip, C. C. Y., Lo, K. H. Y., Wu, S., Situ, J., Chew, N. F. S., Leung, K. H., Chan, H. S. Y., Wong, S. C. Y., Leung, A. W. S., Tse, C. W. S., Fung, K. S. C., Tsang, O. T. Y., Hon, K. L., Cheng, V. C. C., Ng, K. H. L., & Yuen, K. Y. (2022). Hepatitis E Virus Species C Infection in Humans, Hong Kong. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 75(2), 288–296. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab919>
87. Sridhar, S., Yip, C. C. Y., Wu, S., Cai, J., Zhang, A. J.-X., Leung, K.-H., Chung, T. W. H., Chan, J. F. W., Chan, W.-M., Teng, J. L. L., Au-Yeung, R. K. H., Cheng, V. C. C., Chen, H., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Xia, N.-S., Lo, C.-M., & Yuen, K.-Y. (2018a). Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12), 2241–2250. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180937>
88. Sridhar, S., Yip, C. C. Y., Wu, S., Cai, J., Zhang, A. J.-X., Leung, K.-H., Chung, T. W. H., Chan, J. F. W., Chan, W.-M., Teng, J. L. L., Au-Yeung, R. K. H., Cheng, V. C. C., Chen, H., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Xia, N.-S., Lo, C.-M., & Yuen, K.-Y. (2018b). Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12), 2241–2250. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180937>
89. Sridhar, S., Yip, C. C.-Y., Wu, S., Chew, N. F.-S., Leung, K.-H., Chan, J. F.-W., Zhao, P. S., Chan, W.-M., Poon, R. W.-S., Tsoi, H.-W., Cai, J.-P., Chan, H. S.-Y., Leung, A. W.-S., Tse, C. W.-S., Zee, J. S.-T., Tsang, O. T.-Y., Cheng, V. C.-C., Lau, S. K.-P., Woo, P. C.-Y., ... Yuen, K.-Y. (2021). Transmission of Rat Hepatitis E Virus Infection to Humans in Hong Kong: A Clinical and Epidemiological Analysis. *Hepatology*, 73(1), 10–22. <https://doi.org/10.1002/hep.31138>
90. Takahashi, M., Nishizawa, T., Nagashima, S., Jirintai, S., Kawakami, M., Sonoda, Y., Suzuki, T., Yamamoto, S., Shigemoto, K., Ashida, K., Sato, Y., & Okamoto, H. (2014). Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Research*, 180, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.014>
91. Tamura, A., Shimizu, Y. K., Tanaka, T., Kuroda, K., Arakawa, Y., Takahashi, K., Mishiho, S., Shimizu, K., & Moriyama, M. (2007). Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatology Research*, 37(2), 113–120. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00024.x>

92. Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., & Mishiro, S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *The Lancet*, 362(9381), 371–373. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14025-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14025-1)
93. Thapa, R., Pramanik, S., Biswas, B., & Mallick, D. (2009). Hepatitis E virus infection in a 7-year-old boy with glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 31(3), 223–224. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3181984dab>
94. Thomson, K., Luis, D. J., Lagu, J., Laku, R., Dineen, B., Schilperoord, M., Muita, M., Gikunju, S., Waiboci, L., Fields, B., Teshale, E., Gerbi, G., Cookson, S., Handzel, T., Shiferaw, M., & Clarke, K. (2013). Investigation of Hepatitis E Outbreak Among Refugees—Upper Nile, South Sudan, 2012–2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62(29), 581–586.
95. van den Berg, B., van der Eijk, A. A., Pas, S. D., Hunter, J. G., Madden, R. G., Tio-Gillen, A. P., Dalton, H. R., & Jacobs, B. C. (2014). Guillain-Barré syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection. *Neurology*, 82(6), 491–497. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000111>
96. Versluis, J., Pas, S. D., Agteresch, H. J., de Man, R. A., Maaskant, J., Schipper, M. E. I., Osterhaus, A. D. M. E., Cornelissen, J. J., & van der Eijk, A. A. (2013). Hepatitis E virus: An underestimated opportunistic pathogen in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 122(6), 1079–1086. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492363>
97. Villalba, M. C. M., Martínez, D. C., Ahmad, I., Lay, L. A. R., Corredor, M. B., March, C. G., Martínez, L. S., Martínez-Campo, L. S., & Jameel, S. (2017). Hepatitis E virus in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 123, 13–18. <https://doi.org/10.3354/dao03085>
98. Wang, B., & Meng, X.-J. (2021). Structural and molecular biology of hepatitis E virus. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1907–1916. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.038>
99. Wedemeyer, H., Pischke, S., & Manns, M. P. (2012). Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterology*, 142(6), 1388–1397.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.014>
100. Williams, T. P. E., Kasorndorkbua, C., Halbur, P. G., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Toth, T. E., & Meng, X. J. (2001). Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3040–3046. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.9.3040-3046.2001>
101. Wong, Doris C., Purcell, Robert H., Mandayam Ammanjee Sreenivasan, Rama Prasad, S., & Pavri, Khorshed M. (1980). EPIDEMIC AND ENDEMIC HEPATITIS IN INDIA: EVIDENCE FOR A NON-A, NON-B HEPATITIS VIRUS AETIOLOGY. *The Lancet*, 316(8200), 876–879. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)92045-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92045-0)
102. Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tsang, A. K. L., Joseph, M., Wong, E. Y. M., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J., Bai, R., Wernery, R., Wernery, U., & Yuen, K.-Y. (2014). New Hepatitis E Virus Genotype in Camels, the Middle East. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), 1044–1048. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140140>
103. Wu, J., Si, F., Jiang, C., Li, T., & Jin, M. (2015). Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. *Virus Genes*, 50(3), 410–417. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1194-9>
104. Yadav, K. K., Boley, P. A., Fritts, Z., & Kenney, S. P. (2021). Ectopic Expression of Genotype 1 Hepatitis E Virus ORF4 Increases Genotype 3 HEV Viral Replication in Cell Culture. *Viruses*, 13(1), 75. <https://doi.org/10.3390/v13010075>
105. Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Kumar, R., Panda, S. K., & Jameel, S. (1999). Mutational Analysis of Glycosylation, Membrane Translocation, and Cell Surface Expression of the Hepatitis E Virus ORF2 Protein. *Journal of Virology*, 73(5), 4074–4082. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.5.4074-4082.1999>

106. Zamvar, V., McClean, P., Odeka, E., Richards, M., & Davison, S. (2005). Hepatitis E virus infection with nonimmune hemolytic anemia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40(2), 223–225. <https://doi.org/10.1097/00005176-200502000-00027>
107. Zhang, Q., Zong, X., Li, D., Lin, J., & Li, L. (2020). Performance Evaluation of Different Commercial Serological Kits for Diagnosis of Acute Hepatitis E Viral Infection. *Polish Journal of Microbiology*, 69(2), 217–222. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-025>
108. Zhang, X., Bilic, I., Troxler, S., & Hess, M. (2017). Evidence of genotypes 1 and 3 of avian hepatitis E virus in wild birds. *Virus Research*, 228, 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.028>
109. Zhao, C., & Wang, Y. (2016). Laboratory Diagnosis of HEV Infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 948, 191–209. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0942-0_11
110. Zhou, Z., Xie, Y., Wu, C., & Nan, Y. (2021). The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 2 Protein: Beyond Viral Capsid. *Frontiers in Microbiology*, 12, 739124. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.739124>

PRIEDAI

1 priedas. IP naudojant skirtingus blokavimo tirpalus SDS-PAGE gelių nuotraukos. 1, 11 takeliai – baltymų masės standartas, 2, 4, 6 takeliai – naudota 0,2 μ g HEV-3 baltymo, 3, 5, 7 takeliai – naudota 0,6 μ g HEV-3 baltymo, 12, 14, 16 takeliai – naudota 1 μ g žiurkių HEV baltymo, 13, 15, 17 takeliai – naudota 2 μ g žiurkių HEV baltymo, 8, 9, 10 takeliai – baltymo nedėta (neigiama kontrolė). 2, 3, 8, 12, 13 takeliai – dalelės blokuotos PBS-T su 2 % BSA tirpalu, 4, 5, 9, 14, 15 takeliai – dalelės blokuotos Rotiblock tirpalu, 6, 7, 10, 16, 17 takeliai – dalelės blokuotos PBS su 2 % pieno miltelių tirpalu.



2 priedas. IP naudojant skirtingus baltymų skiedimo tirpalus SDS-PAGE gelių nuotraukos. 1, 8 takeliai – baltymų masės standartas, 2, 4, 9, 11 takeliai – naudota 2 μ g antikūno CPB11, 3, 5, 10, 12 takeliai – naudota 2 μ g antikūno CPH7, 6, 7, 13, 14 takeliai – antikūno nedėta (neigiama kontrolė). 2, 4, 6, 9, 11, 13 takeliai – naudota 1 μ g HEV-3 baltymo, 3, 5, 7, 10, 12, 14 takeliai – naudota 2 μ g žiurkių HEV baltymo. 2-7 takeliai – baltymai skiesti PBS-T su 2 % BSA ir 2 mM DTT tirpalu, 9-14 takeliai – baltymai skiesti Assay Defender tirpalu.

