

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 305 077

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-1048**  
(22) Přihlášeno: **20.12.2013**  
(40) Zveřejněno: **22.04.2015**  
**(Věstník č. 16/2015)**  
(47) Uděleno: **11.03.2015**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.04.2015**  
**(Věstník č. 16/2015)**

(56) Relevantní dokumenty:  
Selke M et al. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a Salmonella enterica serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. Infect. Immun., 2007, 75(5), 2476-83.; Matiasovic J et al. Impact of maternally-derived antibodies against Salmonella enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. Vet. J., 2013, 196(1), 114-5.; Leyman B et al. Salmonella Typhimurium LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs. Vaccine, 2011, 29(20), 3679-85.. EP 2189164; WO 2007/112518.

(73) Majitel patentu:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.,  
Brno, CZ  
Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, CZ

(72) Původce:  
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D., Mokrý, CZ  
Mgr. Jan Gebauer, Opava, CZ  
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ  
Mgr. Marcel Kosina, Hranice, CZ  
MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D., Brno, CZ  
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ  
MVDr. Alena Osvaldová, Praha, CZ

tomu zvířata vakcinovaná se identifikují tak, že mají oproti zvířatům infikovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD. Sérologické odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je nutné pro uplatnění ozdravných postupů, jejichž cílem je snížení procenta Salmonella pozitivních jatečných prasat. Dalším důvodem nutnosti odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je vyloučení falešné positivity vakcinovaných prasat při odhadu promořenosti chovů prasat Salmonella ssp. pomocí již zavedených sérologických metod v některých zemích západní Evropy.

(54) Název vynálezu:  
**Použití antigenů Salmonella enterica ssp. enterica sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat**

(57) Anotace:  
Řešení popisuje způsob sérologického odlišení prasat infikovaných Salmonella enterica ssp. enterica sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře Salmonella enterica ssp. enterica sérovar Typhimurium, při kterém se ve vzorku séra stanoví metodu ELISA nebo westernblot hladina protilátek proti alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny SseB, Gene ID: 1252916; SipB, Gene ID: 1254408 a SipD, Gene ID: 1254406 a alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny FliC, Gene ID: 1253480 a YfgL, Gene ID: 1254042. Infikovaná zvířata se identifikují tak, že mají oproti zvířatům vakcinovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL, naproti

CZ 305077 B6

## Použití antigenů *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká sérologické diagnostiky a imunoprophylaxe salmonelových infekcí prasat. Sérologické odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je nutné pro uplatnění ozdravných postupů, jejichž cílem je snížení procenta *Salmonella* pozitivních jatečných prasat. Dalším důvodem nutnosti odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je vyloučení falešné positivity vakcinovaných prasat při odhadu promořenosti chovů prasat *Salmonella ssp.* pomocí již zavedených sérologických metod v některých zemích západní Evropy. Vynález umožňuje sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

### Dosavadní stav techniky

20 Nejčastějšími původci salmonelových infekcí prasat v České republice i většiny zemí Evropské unie jsou netyfoidní sérovary *Salmonella enterica ssp. enterica*, zejména pak sérovary Typhimurium a Derby, které se vyskytují v přibližně 65 % případů kultivačního záchytu salmonel. Dalších 25 % případů kultivačního záchytu salmonel u prasat představují sérovary Enteritidis a Agona (EFSA 2008). Jednou z metod tlumení výskytu netyfoidních salmonelových infekcí prasat může být vakcinace prasat proti původcům infekcí, ale jediná dosud registrovaná vakcína (v Německu a Polsku) je na bázi živého vakcinačního kmene a je zatím jen málo používána. Autoři vynálezu experimentálně ověřili účinnost vakcinace prasnic vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium na snížení množství salmonel v orgánech sajících selat (Matiašovic a kol. 2013) a potvrdili tak účinnost vakcinace prasat inaktivovanou vakcínou *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium pozorovanou dříve na úrovni stáda (Roesler a kol. 2006).

Pro úspěšné zavedení jakékoli vakcíny proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica ssp. enterica* je nutné odlišení zvířat vakcinovaných od zvířat infikovaných. Zavedené sérologické metody detekce protilátek proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica ssp. enterica* u prasat jsou založeny na detekci protilátek proti O–antigenům těchto sérovarů. Po přirozené infekci prasat netyfoidními sérovary *Salmonella enterica ssp. enterica* i po vakcinaci prasat jakoukoli vakcínou obsahující O–antigeny *Salmonella enterica ssp. enterica* dochází k produkci IgG protilátek proti antigenům. Dosavadní sérologické metody tak identifikují prasata vakcinovaná stejně jako prasata infikovaná.

Možností jak sérologicky odlišit infikovaná prasata od prasat vakcinovaných je vývoj vakcín na bázi vakcinačních kmenů postrádajících O–antigeny (Leyman a kol. 2011). Cílené nebo náhodné genetické modifikace vakcinačních kmenů komplikují vývoj vakcíny a případné použití genetiky modifikovaných kmenů znesnadňuje registraci vakcíny.

Živá atenuovaná vakcína registrovaná v Německu a Polsku (IDT Biologica GmbH, Německo) je dále vyvíjena za účelem odlišení postinfekčních a postvakcinačních protilátek. Vakcína indukuje tvorbu protilátek proti O–antigenům. Autoři volili metodu delečního mutanta, kdy vakcinační kmen postrádá protein ompD a tudíž se vůči němu nevytváří po vakcinaci protilátka, na rozdíl od divokého kmene, který stimuluje imunitní systém prasete k produkci protilátek proti ompD proteinu. Odlišení vakcinovaných zvířat od infikovaných tak spočívá v sérologické detekci protilátek proti ompD proteinu. Problém takto upravené živé vakcíny je snížená protektivita oproti původnímu vakcinačnímu kmeni (Selke a kol. (2007)

Vakcína založená na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium (Matiašovic a kol. 2013) je vyvíjena do komerční podoby týmy obou přihlašovatelů. Vakcína indukuje tvorbu protilátek proti O-antigenům. Jiná vakcína založená na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium nebo inaktivované kultuře jiných sérovarů *Salmonella enterica ssp. enterica* není komerčně dostupná.

Je známo, že po infekci lidí nebo zvířat živým kmenem *Salmonella enterica ssp. enterica* dochází k tvorbě protilátek proti různým antigenům tohoto patogena, mimo jiné i proti většině proteinů, které jsou předmětem přihlášky vynálezu (SseB – Lee a kol. 2012, SipB–Durand a kol. 2013, SipD – Desin a kol. 2010, FliC – Bergman a kol. 2005). Předložený vynález umožňuje porovnáním hladin protilátek proti některým proteinům *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium odlišit prasata infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře divokého kmene *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium bez nutnosti modifikace vakcinačního kmene.

#### Literatura k Dosavadnímu stavu techniky

1. The EFSA Journal, 2008, 135: 1–111.

2. Matiasovic, J., Kudlackova, H., Babickova, K., Stepanova, H., Volf, J., Rychlik, I., Babak, V., Faldyna, M. Impact of maternally-derived antibodies against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *Veterinary Journal*. 2013, 196: 114–115.

3. Roesler, U., Heller, P., Waldmann, K. H., Truyen, U., Hensel, A. Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella typhimurium* infection in the offspring. *Journal of Veterinary Medicine B*, 2006, 53, 224–228.

4. Leyman, B., Boyen, F., Van Parys, A., Verbrugghe, E., Haesebrouck, F., Pasmans, F. *Salmonella* Typhimurium LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs. *Vaccine*, 2011, 29: 3679–3685.

5. Selke, M., Meens, J., Springer, S., Frank, R., Gerlach, G. F. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. *Infection and Immunity*, 2007, 75:2476–2483.

6. Lee, S. J., Liang, L., Juarez, S., Nanton, M. R., Gondwe, E. N., Msefula, C. L., Kayala, M. A., Necchi, F., Heath, J. N., Hart, P., Tsolis, R. M., Heyderman, R. S., MacLennan, C. A., Felgner, P. L., Davies, D. H., McSorley, S. J. Identification of a common immune signature in murine and human systemic Salmonellosis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 4998–5003.

7. Durand, D., Ochoa, T. J., Bellomo, S. M., Contreras, C. A., Bustamante, V. H., Ruiz, J., Cleary, T. G. Detection of secretory immunoglobulin A in human colostrum as mucosal immune response against proteins of the type III secretion system of *Salmonella*, *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32: 1122–1126.

8. Desin, T. S., Mickael, C. S., Lam, P. K., Potter, A. A., Köster, W. Protection of epithelial cells from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion by antibodies against the SPI-1 type III secretion system. *Can J Microbiol*, 2010, 56: 522–526.

9. Bergman, M. A., Cummings, L. A., Alaniz, R. C., Mayeda, L., Fellnerova, I., Cookson, B. T. CD4+–T-cell responses generated during murine *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection are directed towards multiple epitopes within the natural antigen FliC. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 7226–7235.

#### Podstata vynálezu

Dosud nebyl znám způsob jak odlišit zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře divokého kmene *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Podstatou vynálezu je zjištění, že po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enteri-*

ca sérovar Typhimurium dochází k tvorbě protilátek proti proteinům *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium kvalitativně jiným způsobem než po infekci a že tento rozdíl je použitelný k odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných.

5 Podstata vynálezu tak spočívá v použití dvou skupin proteinů *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium jako antigenů pro detekci protilátek v séru, kolostru a masové šťávě prasat. Tyto dvě skupiny proteinů rozdílným způsobem indukují tvorbu protilátek po infekci prasat *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

10 Proti proteinům SseB, Gene ID: 1252916; SipB, Gene ID: 1254408, SipD, Gene ID: 1254406 se po přirozené infekci prasat vytváří vysoké hladiny protilátek, zatímco po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium se protilátky proti těmto proteinům netvoří vůbec, nebo jen ve velmi malé míře. To umožňuje detekovat zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

15 Proti proteinům FliC, Gene ID: 1253480; YfgL, Gene ID: 125042 se po přirozené infekci prasat protilátky netvoří vůbec, nebo jen v malé míře, zatímco po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium se proti těmto proteinům vytváří vysoké hladiny protilátek. To umožňuje detekovat zvířata vakcinovaná vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

20 Vyhodnocení hladin protilátek proti proteinům SseB, SipB, SipD a proti proteinům FliC a YfgL tak umožňuje odlišit zvířata infikovaná od zvířat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Vysoká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL identifikuje zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium nebo i jiným sérovarem *Salmonella enterica ssp. enterica*, v závislosti na antigenní příbuznosti uvedených proteinů. Vysoká hladina protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD identifikuje zvířata vakcinovaná vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Vysoké hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata infikovaná i vakcinovaná. Nízké nebo žádné hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata, která buď nebyla infikovaná ani vakcinována nebo zvířata u nichž nedošlo k tvorbě protilátek po infekci nebo vakcinaci.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

40 Sérologické odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných za použití antigenů podle vynálezu je možné například pomocí ELISA testu nebo westernblotu.

#### ELISA test

45 Při použití izolovaného proteinu SseB (GeneID:1252916) jako antigenu v ELISA testu, je naměřená absorbance ve směsném vzorku séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 2x vyšší než ve směsném vzorku séra prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než ve směsném vzorku séra kontrolních neinfikovaných prasat.

50 Při použití izolovaného proteinu FliC (GeneID:1253480) jako antigenu v ELISA testu, je naměřená absorbance ve směsném vzorku séra prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 3x vyšší než ve směsném vzorku séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než ve směsném vzorku séra kontrolních neinfikovaných prasat.

Výše uvedené ELISA testy se připraví potažením jamek jedné mikrotitrační desky rekombinantním proteinem SseB a druhé mikrotitrační desky rekombinantním proteinem FliC, oba v pracovním ředění 1 µg/ml v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 µl na jamku (inkubace 16 hodin, 4 °C). Následně se desky třikrát promyjí PBS v obsahem 0,05% Tween 20 (PBS-T, pH 7,2). Vyšetřované vzorky prasečího séra nebo plazmy se ředí 100x v PBS-T s přídatkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 µl se aplikují do jamek mikrotitrační desky. Po inkubaci (1 h, 37 °C, vlhká komůrka) se desky třikrát promyjí roztokem PBS-T a do jamek se přidá 100 µl konjugátu značeného křenovou peroxidázou (Goat anti-pig IgG conjugate, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) v příslušném pracovním ředění. Po inkubaci (60 min, 37 °C, vlhká komůrka) se desky opět třikrát promyjí a do jamek se přidá 100 µl roztoku substrátu s chromogenem TMB Complete (Test-line, Brno, Česká republika). Enzymatická reakce se zastaví po 10 minutách 50 µl 2M kyseliny sírové. Výsledná absorbance se odečítá pomocí multikanálového spektrofotometru při vlnové délce 450 nm, v našem případě pomocí Synergy H1 (Biotek, USA).

#### Westernblot

Při použití izolovaného proteinu SipB (Gene ID: 1254408) nebo SipB (Gene ID: 1254406) jako antigenu ve westernblot testu je intenzita proužku po inkubaci se směsným vzorkem séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 3x vyšší než po inkubaci se směsným vzorkem séra prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než se směsným vzorkem séra kontrolních neinfikovaných prasat.

Při použití izolovaného proteinu YfgL (Gene ID: 1254042) jako antigenu ve westernblot testu je intenzita proužku po inkubaci se směsným vzorkem séra prasata vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 2x vyšší než po inkubaci se směsným vzorkem séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než se směsným vzorkem séra kontrolních neinfikovaných prasat.

Výše uvedené westernbloty se připraví rozdělením antigenu (rekombinantní protein SipB nebo YfgL) na 7 cm SDS-PAGE gelu o koncentraci akrylamidu 10 %, za použití aparatury Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, USA) (20 min při konstantním napětí 80 V, poté cca 1 h při konst. napětí 110 V). Proteiny z gelu se pomocí aparatury pro polosuchý westernblot (Omni-Bio, Česká republika) přenesou (75 min při konstantním proudu 340 mA) na PVDF membránu (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, Velká Británie). PVDF membrána se blokuje v 0,5% kaseinovém hydrolyzátu v PBS s obsahem 0,05% Tween 20 (PBS-T, pH 7,2) 16 h při 4 °C. Membrána je poté 1 h inkubována s vyšetřovanými vzorky prasečích sér ve 100násobném ředění ve stejném roztoku – PBS-T/kaseinový hydrolyzát za současného třepání při laboratorní teplotě s konjugátem značeným křenovou peroxidázou (Goat anti-pig IgG conjugate, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA, 1000x ředěný v PBS-T/kaseinový hydrolyzát) a následně se opět 5x promyje (PBS-T). Pro vizualizaci antigenu je použit chromogenní substrát diaminobenzidín (13 mg ve 40 ml PBS, po přidání 40 µl peroxidu vodíku). Reakce se zastaví přidáním nadbytku vody. Intenzita zbarvení proužků se měří například na přístroji GelLogic 2200 PRO (Carestream Health, USA). Vyhodnocení intenzity zbarvení proužků lze provést i vizuálně.

#### Vyhodnocení

Vysoká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL identifikuje zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium nebo i jiným sérovarem *Salmonella enterica ssp. enterica*, v závislosti na antigenní příbuznosti uvedených proteinů. Vysoká hladina protilátek proti proteinu

FliC nebo YfgL a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD identifikuje zvířata vakcinovaná vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Vysoké hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata infikovaná i vakcinovaná. Nízké nebo žádné hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata, která buď nebyla infikována ani vakcinována, nebo zvířata, u nichž nedošlo k tvorbě protilátek po infekci nebo vakcinaci.

#### Průmyslová využitelnost

Tvorba detekčních systémů (například ELISA, westernblot) umožňujících sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob sérologického odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se ve vzorku séra stanoví hladina protilátek metodou ELISA nebo westernblot proti alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny SseB, Gene ID: 1252916; SipB, Gene ID: 1254408 a SipD, Gene ID: 1254406 a alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny FliC, Gene ID: 1253480 a YfgL, Gene ID: 1254042, kdy infikovaná zvířata se identifikují tak, že mají oproti zvířatům vakcinovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL, naproti tomu zvířata vakcinovaná se identifikují tak, že mají oproti zvířatům infikovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD.

---

Konec dokumentu

---