

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 402

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/112 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36707**
(22) Přihlášeno: **04.10.2019**
(47) Zapsáno: **19.11.2019**

(73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.,
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Opava, Kateřinky, CZ
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D., Hostěnice, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitého vzoru:
**Vakcína proti infekci Salmonella
Typhimurium**

CZ 33402 U1

Vakcína proti infekci *Salmonella* Typhimurium

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká vakcíny proti infekci *Salmonella* Typhimurium.

Dosavadní stav techniky

10

Infekce netyfoidními sérovary salmonel představují ve veterinární medicíně nezanedbatelný problém mající mimo jiné také zoonotický potenciál. Podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin je až 30 % chovů prasat v Evropě salmonela-pozitivních (EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015; 13(12):4329). Kromě technicko-hygienických opatření je vakcinace jednou z možností, jak předcházet salmonelovým infekcím v chovech. Na evropském trhu je dostupná pouze jediná vakcína pro vakcinaci prasat s názvem Salmoporc® (IDT Biologika), registrovaná však pouze v Německu a Polsku. Jedná se o živou, dvakrát atenuovanou vakcínu odvozenou od kmene *Salmonella* Typhimurium a je určená pro prasata po odstavu. V České republice je nově po registraci inaktivovaná vakcína odvozená od tří nejčastěji se vyskytujících sérovarů Typhimurium, Derby a Infantis. Tato vakcína je určená pro prasnice před porodem a má za cíl chránit novorozená selata přenosem kolostrální/laktogenní imunity (BIOSUIS Salm, Bioveta/VÚVeL).

15

20

25

Původcem salmonelových onemocnění je gram-negativní bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* z čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejčastěji se vyskytujícími sérovary izolovanými z prasat jsou *Salmonella* Typhimurium a Derby. Jedná se o střevní patogen způsobující gastroenteritidu, jejíž klinický průběh, zvláště u prasat, není obvykle výrazný. Může docházet ke krátkodobému zvýšení tělesné teploty, k průjmům, či zvracení a vylučování salmonel do okolí, kde dochází k přenosu na ostatní zvířata, případně i člověka. V chovech prasat navíc dochází ke snížení přirozeného přírůstku infikovaných jedinců.

30

35

40

Po infekci orální cestou se bakterie dostávají do tenkého střeva hostitele a prostupují přes střevní epitel. Jsou dále fagocytovány migrujícími makrofágy, čímž se mohou rozšířit do jiných částí těla infikovaného jedince (do přilehlých mízních uzlin, tonzily). Ve střevě jsou salmonelou exprimovány proteiny, tzv. siderophory, které umožňují těmto bakteriím zvýšené vychytávání iontů železa z prostředí, čímž získávají výhodu nad ostatními bakteriemi běžně se vyskytujícími ve střevě. Pro aktivní pohyb využívá bičíku, složeného z podjednotek proteinu flagelinu, což je jeden z důležitých imunogenních antigenů bakterií. Pro invazi přes epitel střeva využívají salmonely proteinů z tzv. SPI-1 lokusu (*Salmonella* pathogenicity island). Po přestupu do fagocytů, kde je snížené pH, nedostatek živin i iontů, indukují bakterie expresi SPI-2 proteinů, které jim umožňují potlačit tyto mechanismy sloužící k eliminaci fagocytovaných patogenů. Expresí všech těchto zmíněných antigenů se mění v závislosti na fázi infekce a na okolním prostředí, kdy se produkují ve větší míře některé proteiny a jiné jsou potlačeny.

45

Podstata technického řešení

50

Předmětem předkládaného technického řešení je vakcína obsahující směs inaktivovaných bakteriálních kultur kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, přičemž každá inaktivovaná bakteriální kultura má zvýšený obsah alespoň jednoho proteinu vybraného ze skupiny zahrnující proteiny ze SPI-1 lokusu, proteiny ze SPI-2 lokusu, siderophory a flagelární proteiny.

Množství proteinu v bakteriální kultuře je stanoveno pomocí hmotnostní spektrometrie a je určeno poměrem plochy pod chromatografickou křivkou daného proteinu k ploše pod chromatografickou křivkou proteinu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GapA). Protein GapA má stálou míru exprese v kultuře *S. Typhimurium* bez závislosti na okolním prostředí.

5

Zvýšenou produkcí proteinů se rozumí například:

- pro proteiny ze SPI-1 lokusu, relativní množství ku GapA > 0,03;
- pro proteiny ze SPI-2 lokusu, relativní množství ku GapA > 0,003;
- 10 - pro siderophory, relativní množství ku GapA > 0,05;
- pro flagelární proteiny, relativní množství ku GapA > 0,5.

Bakteriální kultury se zvýšeným obsahem těchto proteinů jsou připravené kultivací ve specifickém médiu a následnou inaktivací.

15

Bakteriální kultura se zvýšeným obsahem proteinů ze SPI-1 lokusu je připravená kultivací v LB médiu, obsahujícím 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasinkového extraktu a 5 g/l chloridu sodného, pH 6 až 7, a následnou inaktivací.

20

Bakteriální kultura se zvýšeným obsahem proteinů ze SPI-2 lokusu je připravená kultivací v LPM médiu, obsahujícím 5 mM chlorid draselný, 7,5 mM síran amonný, 0,5 mM síran draselný, 0,337 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 8 µM chlorid hořečnatý hexahydrát, 38 mM glycerol, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, 80 mM morfolinoethansulfát, pH 4,7, a následnou inaktivací.

25

Bakteriální kultura se zvýšeným obsahem siderophorů je připravená kultivací v Minca médiu, obsahujícím 10 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 28 mM hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, 40 µM síran hořečnatý heptahydrát, 5 µM chlorid manganatý tetrahydrát, 0,5 µM chlorid železitý hexahydrát, 1,8 µM chlorid vápenatý hexahydrát, 0,1 % kaseinový hydrolyzát,

30

Bakteriální kultura se zvýšeným obsahem flagelinů (flagelárních proteinů) je připravená kultivací v LB nebo Minca médiu, a následnou inaktivací.

35

Ve výhodném provedení obsahuje vakcína směs inaktivovaných bakteriálních kultur kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, sestávající z bakteriální kultury připravené kultivací v LB médiu, bakteriální kultury připravené kultivací v LPM médiu a bakteriální kultury připravené kultivací v Minca médiu.

40

V některých provedeních může vakcína dále obsahovat i supernatant z kultivace bakteriálních kultur, které jsou součástí vakcíny.

Vakcína dále obsahuje alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku. Farmaceuticky přijatelná pomocná látka může být vybrána ze skupiny zahrnující rozpouštědla, stabilizátory,

45

Předmětem předkládaného technického řešení je dále sada kultivačních médií pro přípravu uvedených vakcín, která obsahuje:

50

- LB médium, obsahující 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasinkového extraktu a 5 g/l chloridu sodného, pH 6 až 7;
- LPM médium, obsahující 5 mM chlorid draselný, 7,5 mM síran amonný, 0,5 mM síran draselný, 0,337 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 8 µM chlorid hořečnatý hexahydrát,
- 55 38 mM glycerol, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, 80 mM morfolinoethansulfát, pH 4,7

- Minca médium, obsahující 10 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 28 mM hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, 40 μ M síran hořečnatý heptahydrát, 5 μ M chlorid manganatý tetrahydrát, 0,5 μ M chlorid železitý hexahydrát, 1,8 μ M chlorid vápenatý hexahydrát, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, pH 7,4.

V rámci předkládaného technického řešení bylo ověřeno, že při přirozené infekci ani při laboratorní kultivaci nejsou všechny zmíněné proteiny produkovány ve stejnou dobu za stejných podmínek v dostatečném množství. Proto se ve výhodném provedení předkládaného vynálezu využívá několik kultivačních médií, které simulují *in vivo* prostředí v různých částech těla hostitele při infekci. V lumen tenkého střeva je dostatek živin, při kultivaci se tedy používá bohaté LB médium při pH do 7, ve kterém se ve velké míře produkují proteiny ze SPI-1 lokusu a také proteiny bičíku - flageliny. Pro indukci zvýšené exprese siderophorů se použije tzv. Minca médium - médium se sníženou koncentrací iontů železa, vápníku, hořčíku a manganu při pH 7,4. V intracelulární fázi infekce jsou salmonely vystaveny sníženému pH a nízkému obsahu živin uvnitř fagocytů, tyto podmínky se v předkládaném vynálezu simulují například minimálním LPM médiem (médium s nízkým obsahem fosfátů a hořčíku, Low Phosphate and Magnesium). Jde o médium s nízkým obsahem aminokyselin a minimálním obsahem fosforečných a hořečnatých iontů s pH 4,7, které zajišťuje pufrovací systém MES (2-morfolinoethansulfát). V tomto médiu jsou ve větší míře exprimovány proteiny SPI-2 lokusu, které se *in vivo* účastní obrany před eliminačními mechanismy fagolysosomu makrofágů.

Protože se jedná o inaktivovanou vakcínu, kdy na rozdíl od živých vakcín bakterie nejsou životaschopné a nemění tak expresi různých skupin proteinů v závislosti na prostředí, lze zajistit požadované spektrum antigenů ve vakcíně kombinací několika bakteriálních kultur. Imunitnímu systému hostitele se tak předkládají všechny potenciální bakteriální antigeny, které by jinak nemohly být dostupné.

Vakcína podle předkládaného vynálezu je určena zejména pro veterinární použití, s výhodou pro vakcinaci prasat.

Objasnění výkresů

Obrázek 1 Relativní kvantifikace vybraných zástupců sledovaných skupin proteinů při kultivaci salmonel v různých médiích. Osa y udává poměr plochy píků proteinu k ploše píků normalizačního proteinu GapA, stanovené hmotnostní spektrometrií. 1), 2) a 4) udávají jednotlivé kultivace salmonel, 3) pak supernatant kultivace salmonel v LPM médiu.

Obrázek 2 Hladiny specifických IgG protilátek proti vybraným salmonelovým antigenům. Každý graf zobrazuje dynamiku tvorby protilátek u celé skupiny selat – nevakcinovaná skupina, skupina vakcinovaná směsí inaktivovaných kultur salmonel (STM) a skupina vakcinovaná směsí rekombinantních proteinů (REK). Odběry krve byly provedeny v době vakcinace, po 3 týdnech při revakcinaci a po dalších 17 dnech po skončení infekčního pokusu – při jejich utracení. Body označují průměr a směrodatnou odchylku všech zvířat ve skupině. Osa y zobrazuje hodnoty absorbance IgG protilátek po vazbě sekundární protilátky s křenovou peroxidázou. Jednotlivé skupiny antigenů (SPI-1, SPI-2, siderophory a ostatní) jsou vyvedeny v různém stupni šedi.

Obrázek 3 Průměrná teplota všech zvířat ve skupinách A, B a C před infekcí (DPIO), a jeden den (DPI1), respektive dva dny (DPI2) po infekci. Hodnoty p definují statistickou významnost rozdílů (t-test).

Obrázek 4 Kolonizace orgánů prasat bakteriemi tři dny po infekci kmenem *Salmonella Typhimurium*. Hodnoty jsou zobrazeny v logaritmu CFU (colony-forming units) na gram tkáně. Sloupce zobrazují průměr všech zvířat ve skupině a jeho směrodatnou odchylku. Hodnoty p

definují statistickou významnost rozdílů (t-test) u obsahu ilea a stěny colonu mezi skupinami A a B.

5 Příklad uskutečnění technického řešení

Předkládané technické řešení je dále ilustrováno v následujícím příkladu provedení a testech. V následujícím textu jsou údaje v % uváděny v hmotnostních procentech, není-li uvedeno jinak.

10 Kultivace bakterií

Bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium DT104 byly odděleně kultivovány ve třech médiích:

15 1) LB médium (10 g peptonu, 5 g kvasinkového extraktu a 5 g NaCl), pH 7, kultivace přes noc při 37 °C za stálého třepání.

20 2) LPM médium (5 mM KCl, 7,5 mM (NH₄)₂SO₄, 0,5 mM K₂SO₄, 0,337 mM KH₂PO₄, 8 μM MgCl₂·6H₂O, 38 mM glycerol, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, 80 mM MES), úprava na pH 4,7, kultivace přes noc při 37 °C za stálého třepání.

25 3) Minca médium (10 mM KH₂PO₄, 28 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 40 μM MgSO₄·7H₂O, 5 μM MnCl₂·4H₂O, 0,5 μM FeCl₃·6H₂O, 1,8 μM CaCl₂·6H₂O, 0,1 % kaseinový hydrolyzát), úprava na pH 7,4, kultivace přes noc při 37 °C za stálého třepání.

30 Bakteriální kultury byly po kultivaci centrifugovány 10 minut při 4000 x g při 20 °C, supernatant z LPM kultury byl odebrán a filtrován přes 0,2 μm bakteriální filtr. Supernatanty z LB a Minca kultur byly odebrány a dále se nepoužily. Pelety buněk všech tří kultur byly promyty v PBS (Lonza) a opět centrifugovány za stejných podmínek, supernatanty nebyly dále použity. Supernatant z bakteriální kultury pěstované v LPM médiu obsahoval sekretované SPI-2 proteiny, které budou využity jak pro měření obsahu proteinů, tak pro následnou vakcinaci. Tyto sekretované proteiny jsou však v supernatantu ve velmi malé koncentraci, proto byly salmonely v LPM médiu pěstovány v objemu 4 l a supernatant byl po kultivaci koncentrován pomocí ultrafiltračního zařízení Amicon Stirred Cell 8050 (Millipore) s membránovým filtrem o velikosti
35 porů 10 kDa. Výsledný objem byl zhruba 4 ml.

Charakterizace proteomu

40 Pelety buněk všech tří kultivací byly resuspendovány ve sterilním PBS pufru, byly přidány 0,1 mm zirkonium/křemenné kuličky (BioSpec products) a buňky byly následně rozbity sonikací (Sonoplus HD 3100, Bandelin) po dobu 3 minut při 75% amplitudě v ledové lázni. Po centrifugaci při 20000 x g po dobu 10 minut při 4 °C byly supernatanty (sonikáty) odebrány a filtrovány přes 0,2 μm bakteriální filtr. Pelety byly dále rozpuštěny v (1/10 původního objemu) resuspendačním roztoku (8 M močovina, 0,1 % SDS, 0,2 % Triton X-100, 25 mM hydrogenuhličitan amonný - TEAB) a po dobu 2 hodin třepány při 20 °C. Po centrifugaci při
45 20000 x g po dobu 10 minut při 4 °C byly tyto supernatanty filtrovány a smíchány se sonikáty z předchozího kroku. Pomocí kitu PierceBCA Protein Assay (Thermo Scientific) byly ve všech třech lyzátech a koncentrovaném supernatantu z LPM kultury změřena celková koncentrace proteinů. 50 μg proteinů bylo použito pro přípravu každého vzorku metodou FASP (Wiśniewski
50 JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M: Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods 2009; 6(5):359–62) na hmotnostně spektrometrickou analýzu. Každý vzorek byl pětikrát promyt v 8M močovíně v centrifugačních kolonkách Vivacon 500 (Sartorius Stedim) s 10.000 MWCO membránovým filtrem. 10 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich) a 50 mM jodacetamid (Serva) v 25 mM TEAB pufru (Sigma-Aldrich) byl použit pro redukci, respektive
55 alkylaci proteinů. Proteiny byly poté štěpeny trypsinem (Sequencing Grade Modified Trypsin,

Promega) v poměru 1:50 po dobu jedné hodiny při 37 °C, poté přes noc při 25 °C. Po centrifugaci Vivacon kolonky byly naštěpené peptidy odpařeny (DNA120 SpeedVac, Thermo Savant) a peletka peptidů resuspendována v 0,1% vodném roztoku kyseliny mravenčí (Sigma-Aldrich), což je mobilní fáze kapalinové chromatografie (UltiMate 3000 RSLCnano, Dionex -
 5 Thermo Scientific) před samotnou analýzou hmotnostním spektrometrem. Pro separaci a eluci peptidů byl použit dvouhodinový gradient se zvyšující se koncentrací acetonitrilu (0,1 % kyseliny mravenčí v acetonitrilu, obé Sigma-Aldrich) (0 min – 4 %, 4 min – 4 %, 98 min – 45 %, 98,5 min – 90 %, 112 min – 90 %, 112,5 min – 4 %, 120 min – 4 %). Peptidy byly separovány na 25 cm koloně (Acclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 10 nm, 75 µm I.D., Thermo Scientific) při průtoku
 10 300 nl/min. uHPLC byl napojen na iontový zdroj EASY-Spray a hmotnostní spektrometr Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific). Skenování probíhalo v rozmezí m/z 390 až 1700, a protonované peptidy s nábojovým číslem 2 a více byly automaticky vybrány pro data dependentní analýzu MS/MS a fragmentovány kolizí s plynem helia. Deset fragmentačních spekter bylo naměřeno po každém full skenu. Naměřená spektra byla poté zpracována pomocí
 15 softwaru Proteome Discoverer (ver. 1,4, Thermo Scientific) s prohledávacím algoritmem Sequest HT. Oxidace methioninu a deamidace asparaginu a glutaminu byly přidány jako dynamické, karbamidomethylace cysteinu jako statické modifikace peptidů. Hmotnostní tolerance byly nastaveny na 10 ppm pro prekurzorové a 0,5 Da pro fragmentové ionty. Naměřená spektra byla prohledána proti Uniprot databázi kmene Salmonella (2018/04). Pouze peptidy s FDR (false
 20 discovery rate) 0,01 byly považovány za správně identifikované.

Kvantita vybraných proteinů je vyjádřena plochou pod křivkou chromatografického píku detekovaného hmotnostním spektrometrem. Relativní kvantifikace je pak průměrem tří
 25 nejabundantnějších identifikovaných peptidů daného proteinu vztažený na kvantitu proteinu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (Uniprot číslo P0A1P0), který slouží jako normalizační faktor exprese. Obrázek č. 1 vyjadřuje porovnání obsahu některých zástupců sledovaných skupin proteinů v různých kultivačních podmínkách. SPI-1 proteiny (zde zástupci SipA, SipB, SipC, SipD a PrgI) jsou produkovány v největší míře v bohatém LB médiu, oproti tomu SPI-2 proteiny (sledovaní zástupci SseB, PipB2 a SopD2) se spíše produkují v LPM médiu s nízkým pH. Obsahují je samotné buňky, ale jsou také sekretovány do média, ačkoliv jejich absolutní koncentrace je řádově nižší, než v případě SPI-1 proteinů v LB médiu. Salmonelové siderophory (IroN, CirA a FepA) jsou produkovány výhradně v Minca médiu a flagelin (FliC) v LB a Minca médiu.

35 Příprava vakcíny podle technického řešení

Vakcína podle technického řešení byla připravena inokulací 10 ml tekutého LB média, LPM média a Minca média vždy jednou kolonií bakterií *S. Typhimurium* z pevné půdy (LB médium s 20 g/l agaru, kultivace přes noc při 37 °C). Všechny tři tekuté kultury byly přes noc za stálého
 40 třepání kultivovány při 37 °C. Poté byly kultury centrifugovány při 4000 x g 10 minut při laboratorní teplotě. Buněčné pelety byly promyty 10 ml sterilního PBS a opět centrifugovány. Peleta buněk byla poté resuspendována ve sterilním PBS na koncentraci odpovídající optické hustotě 8,5 při 600 nm (OD₆₀₀). Všechny tři bakteriální kultury byly inaktivovány formaldehydem v celkové koncentraci 1 % po dobu 16 hodin. Poté byly všechny tři kultury
 45 smíchány v poměru 1:1:1. K této směsi byl přidán koncentrovaný supernatant LPM kultury (připravený podle postupu výše) v množství 50 µg, podle koncentrace proteinů, na 1 ml směsi bakteriálních kultur.

50 Vakcinace a infekce prasat

27 selat po odstavu bylo rozděleno do 3 skupin. Skupina A (9 selat) nebyla vakcinovaná a sloužila jako negativní kontrola. Vakcíny pro skupiny B (10 selat) a C (8 selat) byly připraveny smícháním antigenu s adjuvans Montanide ISA50V2 (Seppic) v poměru 1:1. Selata byla vakcinovaná dávkou 0,5 ml intramuskulárně do oblasti krku. 21 dní od první vakcinace byla
 55 selata skupiny B a C revakcinovaná ve stejném schématu.

Skupina B byla vakcinována vakcínou podle předkládaného technického řešení, připravenou postupem uvedeným výše.

- 5 Skupina C byla vakcinována ekvimolární směsí purifikovaných rekombinantních salmonelových proteinů (SipB, SipC, SipD, PrgI, SseB, PipB2, SopD2, SifB, IroN, CirA a FliC) v množství 0,5 mg celé směsi na zvíře. Tyto rekombinantní proteiny byly produkovány v expresním systému *Escherichia coli* (viz Gebauer J, Kudláčková H, Kosina M, Kovařík K, Tesařík R, Osvaldová A, Faldyna M, Matiašovic J: A proteomic approach to the development of DIVA ELISA
10 distinguishing pigs infected with *Salmonella* Typhimurium and pigs vaccinated with a *Salmonella* Typhimurium-based inactivated vaccine. BMC Veterinary Research 2016; 12:252).

Při prvotní vakcinaci, revakcinaci a při následné infekci byla všem prasatům odebrána krev k sérologickému stanovení.

15

- Po 14 dnech od revakcinace byla všechna prasata infikovaná noční statickou kulturou *S. Typhimurium* v BHI médiu (1×10^8 CFU) smíchanou s ovesnou kaší. 1 ml této směsi byl aplikován každému zvířeti do ústní dutiny. V den infekce a následující dva dny byla selatům měřena rektální teplota a po třech dnech od infekce byla utracena v celkové anestezii. Byly
20 odebrány vzorky orgánů (slezina, játra, ileocécální mizní uzlina, stěna a obsah ilea, stěna a obsah colonu, caecum, submandibulární mizní uzlina a tonzila) k bakteriologickému vyšetření.

Měření protilátkové odpovědi

- 25 Hladiny specifických IgG protilátek proti vybraným salmonelovým antigenům byly stanoveny metodou ELISA. ELISA test byl připraven potažením jamek mikrotitrační desky rekombinantními salmonelovými proteiny (SipB, SipC, PrgI, SseB, PipB2, SopD2, IroN, CirA a FliC) a izolovaným lipopolysacharidem salmonel (LPS) v pracovním ředění 1 $\mu\text{g/ml}$ v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 μl na jamku (inkubace
30 16 hodin při 4 °C). Následně byly desky třikrát promyty PBS s obsahem 0,05% Tween 20 (PBS-T, pH 7,2) a blokovány roztokem 0,5% kaseinového hydrolyzátu v PBS-T (inkubace 30 minut při laboratorní teplotě). Vyšetřované vzorky sér byly ředěny 100x nebo 300x v PBS-T s přídavkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 μl byly aplikovány do jamek mikrotitrační desky. Po inkubaci (1 h, laboratorní teplota, vlhká komůrka) byly desky třikrát promyty roztokem PBS-
35 T a do jamek bylo přidáno 100 μl sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou (Goat anti-pig IgG conjugate, Bethyl Laboratories) v příslušném pracovním ředění. Po inkubaci (60 min, laboratorní teplota, vlhká komůrka) byly desky opět třikrát promyty a do jamek bylo přidáno 100 μl roztoku substrátu s chromogenem TMB Complete (Test-line). Enzymatická reakce byla zastavena po několika minutách přídavkem 50 μl 2 M kyseliny sírové (Penta).
40 Výsledná absorbance byla odečtena pomocí multikanálového spektrofotometru Synergy H1 (Biotek) při vlnové délce 450 nm.

- U prasat po vakcinaci směsí inaktivovaných kultur salmonel v různých kultivačních médiích (skupina B) došlo ke zvýšení hladin specifických protilátek proti proteinům SipC ($p=0,001$,
45 oproti nevakcinované kontrole při utracení - skupina A, stanovené t-testem) a PrgI ($p<0,001$) ze skupiny SPI-1 proteinů; SseB ($p<0,001$) a PipB2 ($p<0,001$) ze skupiny SPI-2; flagelárnímu proteinu FliC ($p<0,001$) a lipopolysacharidu (LPS, $p<0,001$). Naopak proti proteinům SipB (SPI-1, $p=0,169$), SopD2 (SPI-2, $p=0,921$) a proti siderophorům IroN ($p=0,648$) a CirA ($p=0,648$) nedošlo ke zvýšení hladin IgG protilátek u takto vakcinovaných jedinců.

50

U skupiny C - vakcinované směsí rekombinantních proteinů došlo k výraznému zvýšení IgG protilátek proti všem přítomným proteinům ($p<0,001$). Nedošlo ke zvýšení protilátek proti LPS, který nebyl součástí vakcíny (viz obrázek 2).

Stanovení klinických projevů salmonelové infekce

Selatům ze všech tří skupin byla měřena rektální teplota před infekcí (DPI0) a poté jeden (DPI1), respektive dva (DPI2) dny po infekci. Grafické vyjádření naměřených hodnot je uvedeno obrázku 3. Ve všech třech skupinách došlo ke zvýšení průměrné teploty jeden den po infekci. U skupiny A a C jsou rozdíly průměrných teplot mezi DPI0 a DPI1 vysoce statisticky významné (A - $p=0,0001$; C - $p=0,0037$; t-test), u skupiny B jsou tyto rozdíly statisticky významné ($p=0,0336$). U skupiny B – vakcinované směsi inaktivovaných kultur salmonel je navíc zvýšení průměrné teploty statisticky nižší ($p=0,0223$), než ve skupinách A a C první den po infekci. Vakcinace touto variantou vakcíny tedy brání výraznému zvýšení rektální teploty oproti kontrolní skupině. Z dalších klinických příznaků bylo zjištěno zvracení u kontrolní skupiny A a průjem u skupiny C jeden den po infekci. Skupina B byla po celou dobu infekce bez těchto projevů. Druhý den po infekci se u skupin A a B vrátila teplota opět do původních hodnot, u skupiny C zůstala v DPI2 teplota na stejné hodnotě jako v DPI1.

Kolonizace orgánů bakteriemi salmonel po infekci

Všechna selata byla po ukončení pokusu utracena vykvrvením z arteria brachialis v celkové anestezii navozené přípravkem Zoletil (Virbac). Při pitvě byla odebrána tkáň – slezina, játra, ileocékální mízní uzlina, stěna ilea, obsah ilea, stěna colonu, obsah colonu, caecum, submandibulární mízní uzlina a tonzila. Vzorek tkáně o hmotnosti 0,1 g byl odebrán do zkumavky s 1 ml peptonové vody a 2,3 mm zirkonium/křemennými kuličkami. Vzorky byly homogenizovány na přístroji MagNALyser (Roche) ve dvou cyklech po 30 s při 7000 otáčkách. Homogenáty byly vysety na misky s XLD agarem v desítkovém ředění. Počty salmonel byly vyjádřeny logaritmy. Negativní vzorky byly obohaceny v polotekutém Rappaport-Vassiliadis médiu (Oxoid) pro kvalitativní stanovení. Vzorkům pozitivním až po tomto obohacení byla přiřazena hodnota 1,000, negativní vzorky i po obohacení měly hodnotu 0. Slezina a játra byla negativní na přítomnost salmonel u všech tří skupin selat. U většiny ostatních orgánů a tkání jsme pozorovali snížené průměrné hodnoty u skupiny B oproti skupinám A a C. Statistická významnost rozdílů mezi kontrolní skupinou (A) a skupinou vakcinovanou směsí bakteriálních kultur (B) se prokázala u vzorků colonu a obsahu ilea. U zvířat skupiny C nebyl zaznamenán žádný rozdíl oproti kontrolní skupině (viz obrázek 4).

Inaktivovaná vakcína připravená z kultur *Salmonella* Typhimurium se zvýšeným obsahem uvedených proteinů tedy indukuje u odstavených selat zvýšenou tvorbu specifických IgG protilátek proti zmíněným antigenům. U takto vakcinovaných selat pak po infekci homologním kmenem bakterie dochází k méně závažným klinickým příznakům (teplota, průjem, zvracení) a také ke snížení kolonizace střeva (obsah ilea, stěna colonu) oproti nevakcinovaným prasatům.

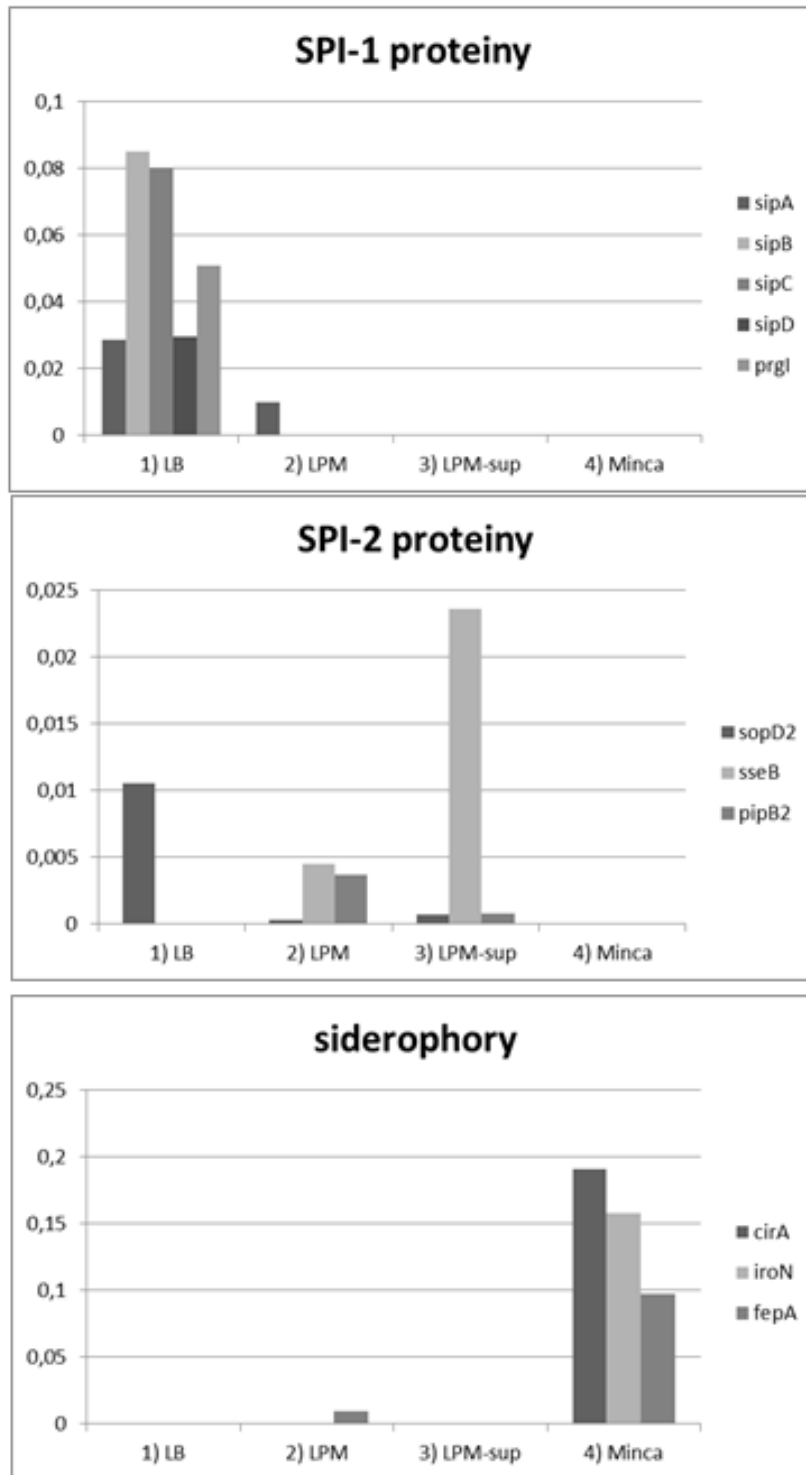
NÁROKY NA OCHRANU

1. Vakcína proti infekci *Salmonella* Typhimurium, **vyznačující se tím**, že obsahuje směs inaktivovaných bakteriálních kultur kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, přičemž jednotlivé bakteriální kultury jsou připraveny uvedené bakterie v médiu vybraném ze skupiny zahrnující

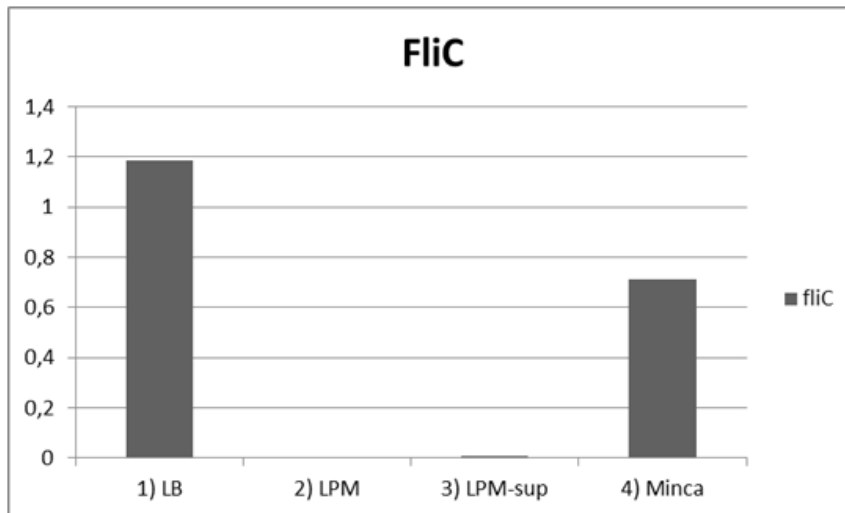
- LB médium obsahující 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasinkového extraktu a 5 g/l chloridu sodného, pH 6 až 7,
- LPM médium obsahující 5 mM chlorid draselný, 7,5 mM síran amonný, 0,5 mM síran draselný, 0,337 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 8 μ M chlorid hořečnatý hexahydrát, 38 mM glycerol, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, 80 mM morfolinoethansulfát, pH 4,7, a

- Minca médium obsahující 10 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 28 mM hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, 40 μ M síran hořečnatý heptahydrát, 5 μ M chlorid manganatý tetrahydrát, 0,5 μ M chlorid železitý hexahydrát, 1,8 μ M chlorid vápenatý hexahydrát, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, pH 7,4,
- 5 a následnou inaktivací, a vakcína dále obsahuje alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.
2. Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje směs inaktivovaných bakteriálních kultur kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, sestávající z bakteriální kultury připravitelné kultivací v LB médiu, bakteriální kultury připravitelné kultivací v LPM médiu a bakteriální kultury připravitelné kultivací v Minca médiu.
- 10
3. Vakcína podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje supernatant z kultivace bakteriálních kultur, které jsou součástí vakcíny, ve výhodném provedení supernatant z kultivace v LPM médiu.
- 15
4. Vakcína podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že farmaceuticky přijatelná pomocná látka je vybrána ze skupiny zahrnující rozpouštědla, stabilizátory, imunogenní adjuvanty, inaktivační činidla.
- 20
5. Sada kultivačních médií pro přípravu vakcíny podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že obsahuje:
- 25
- LB médium, obsahující 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasinkového extraktu a 5 g/l chloridu sodného, pH 6 až 7;
 - LPM médium, obsahující 5 mM chlorid draselný, 7,5 mM síran amonný, 0,5 mM síran draselný, 0,337 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 8 μ M chlorid hořečnatý hexahydrát, 38 mM glycerol, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, 80 mM morfolinoethansulfát, pH 4,7
 - Minca médium, obsahující 10 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 28 mM hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, 40 μ M síran hořečnatý heptahydrát, 5 μ M chlorid manganatý tetrahydrát, 0,5 μ M chlorid železitý hexahydrát, 1,8 μ M chlorid vápenatý hexahydrát, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, pH 7,4.
- 35

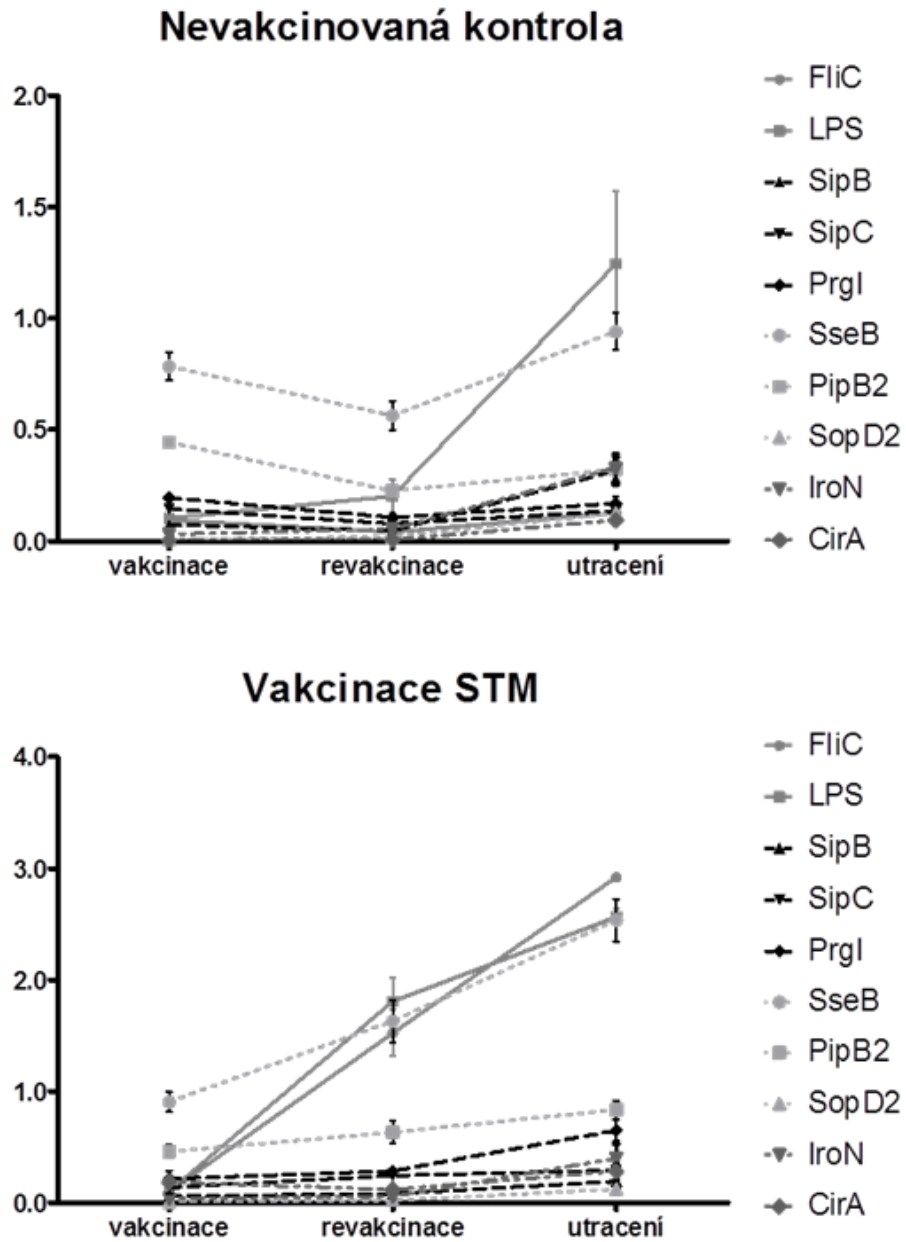
6 výkresů



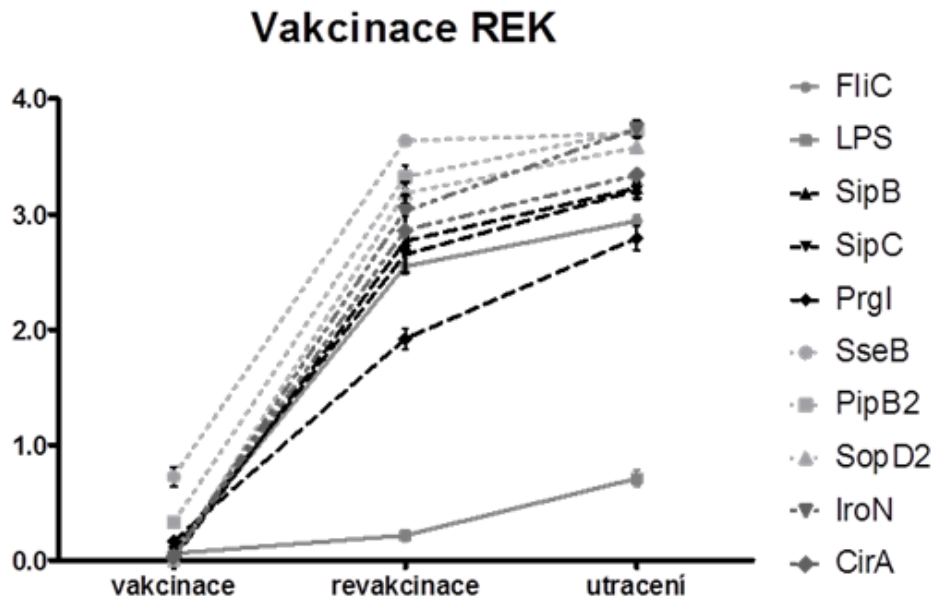
Obr. 1



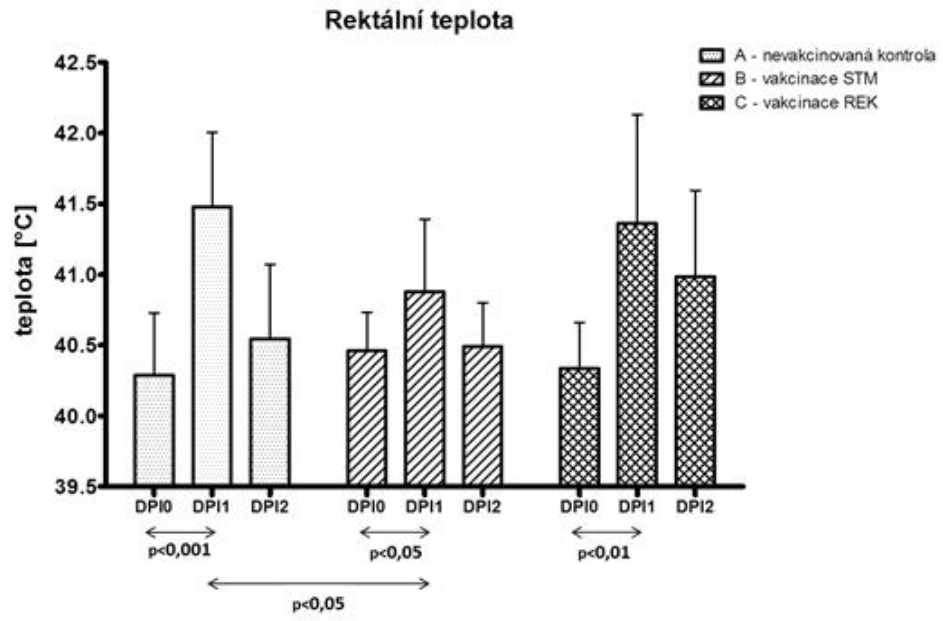
Obr. 1 – pokračování



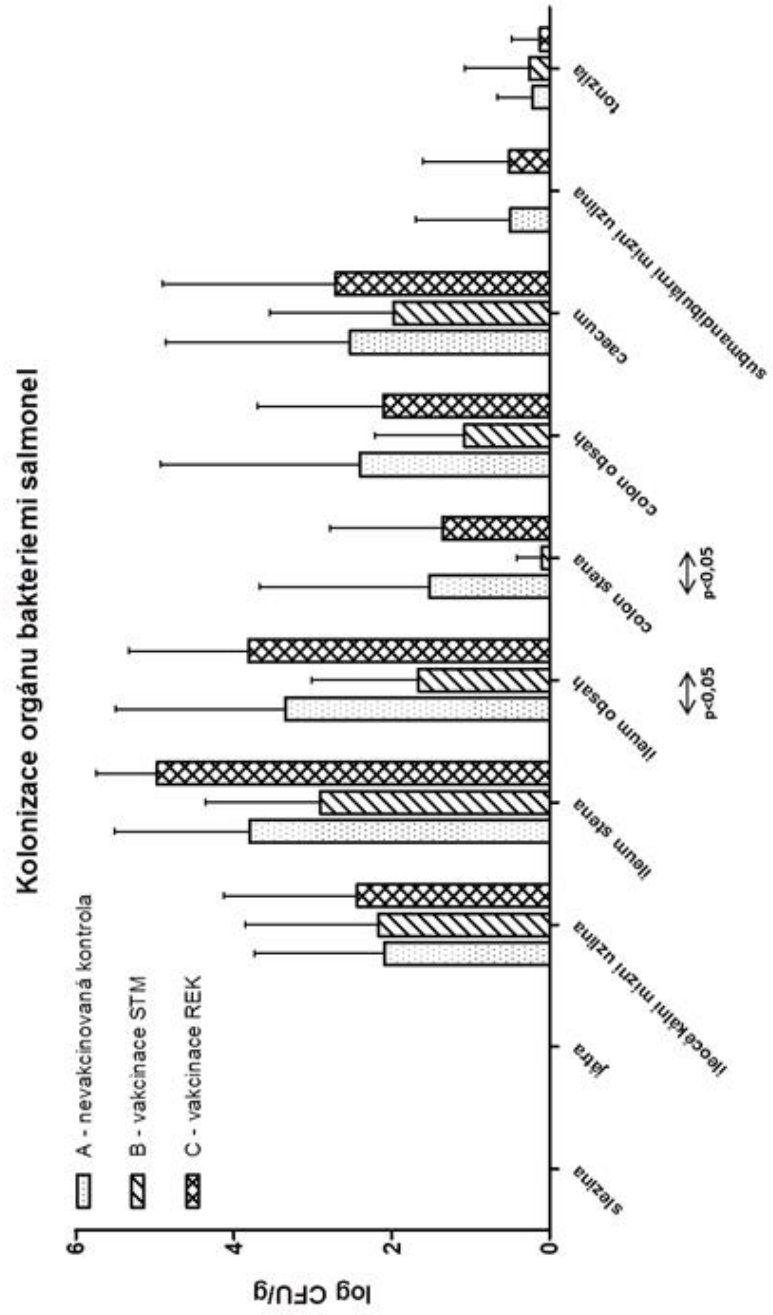
Obr. 2



Obr. 2 – pokračování



Obr. 3



Obr. 4