



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88307

(13) C2

(51) МПК (2009)

G01N 33/68

G01N 33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ LAWSONIA INTRACELLULARIS

1

(21) a200700277  
(22) 23.06.2005  
(24) 12.10.2009  
(86) РСТ/ЕР2005/006781, 23.06.2005  
(31) 04014804.1  
(32) 24.06.2004  
(33) ЕР  
(31) 04027193.4  
(32) 16.11.2004  
(33) ЕР  
(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.  
(72) МЕРЗА МАЛІК, SE  
(73) БЬОРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА ГМБХ, DE  
(56) US 5714375 A, 03.02.98.  
WO 2004033631 A, 22.04.04.  
EP 1403643 A, 31.03.04.  
WO 0226250 A, 04.04.02.  
EP 1219711 A, 03.07.02.  
(57) 1. Спосіб діагностики преклінічної або клінічної інфекції, яка викликається *Lawsonia intracellularis*, який включає наступні стадії:  
а) виявляють специфічне зв'язування рідкого зразка з антитілом *L.intracellularis*, де антитіло вибирають із групи, яка включає моноклональне антитіло 301:39, отримане з лінії клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092205, моноклональне антитіло 287:6, отримане з лінії клітин гібридоми

2

ECACC, реєстраційний номер 04092203, моноклональне антитіло 268:29, отримане з лінії клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092206, моноклональне антитіло 110:9, отримане з лінії клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092204, моноклональне антитіло 113:2, отримане з лінії клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092201, та моноклональне антитіло 268:18, отримане з лінії клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092202,  
б) порівнюють результат, отриманий на стадії а) з контролем.  
2. Спосіб за п. 1, у якому вказаний спосіб являє собою імунний аналіз.  
3. Спосіб за п. 1 або 2, у якому вказаний спосіб являє собою ELISA.  
4. Лінія клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092204, яка секретує антитіло 110:9.  
5. Лінія клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092201, яка секретує антитіло 113:2.  
6. Лінія клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092202, яка секретує антитіло 268:18.  
7. Лінія клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092206, яка секретує антитіло 268:29.  
8. Лінія клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092203, яка секретує антитіло 287:6.  
9. Лінія клітин гібридоми ECACC, реєстраційний номер 04092205, яка секретує антитіло 301:39.

Даний винахід належить до галузі ветеринарії й насамперед стосується *Lawsonia intracellularis*. Зокрема винахід стосується способу діагностики інфекції, яка викликається *Lawsonia intracellularis*, і діагностичного тест-набору, який містить антитіла, специфічні для *Lawsonia intracellularis*. Винахід стосується також застосування способу або тест-набору для діагностики інфекцій, які викликаються *Lawsonia intracellularis*.

*L. intracellularis*, збудник проліферативної ентеропатії свиней («ПЕС»), уражає практично всіх тварин, включаючи людей, кроликів, тхорів, хом'яків, лисиць, коней і різних представників інших класів тварин, таких як страуси й ему. *L.*

*intracellularis* є найпоширенішою причиною втрат поголів'я свиней у Європі, а також у Сполучених Штатах.

Характерною рисою ПЕС є присутність інтрацитоплазматичних незв'язаних з мембраною вигнутих бацил всередині ентероцитів в інфікованих ділянках кишечника. Бактерії, зв'язані з ПЕС, були названі «*Campylobacter*-подібними організмами» [S. McOrist і ін., Vet. Pathol., том 26, 1989, стор. 260-264]. Потім бактерії-збудники були охарактеризовані як новий таксономічний рід й види під загальноживаною назвою *Ileal symbiont* (IS) *intracellularis* [C. Gebhart і ін., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, том. 43(3), 1993, стор. 533-538]. В

(13) C2

(11) 88307

(19) UA

останні роки ці новим бактеріям була дана таксономічна назва *Lawsonia* (*L.*) *intracellularis* [S. McOrist і ін., *Int'l. J. of Systemic Bacteriology*, том 45 (4), 1995, стор. 820-825]. Ці три назви можна використовувати взаємозамінно для позначення того самого організму, як він ідентифікований і описаний далі в даному описі.

*L. intracellularis* є облигатною внутрішньоклітинною бактерією, яку не можна культивувати за допомогою звичайних бактеріологічних методів на стандартних безклітинних середовищах, і передбачається, що для свого росту вони повинні прикріплюватися до епітеліальних клітин. В S. McOrist і ін., *Infection and Immunity*, том 61 (19), 1993, стор. 4286-4292 і G. Lawson і ін., *J. of Clinical Microbiology*, том 31 (5), 1993, стор. 1136-1142 описане культивування *L. intracellularis* з використанням моношарів епітеліальних клітин кишечнику шурів лінії IEC-18 у стандартних колбах для культури тканини. Крім того, в H. Stills, *Infection and Immunity*, том 59 (9), 1991, стор. 3227-3236 описане застосування моношарів людських ембріональних клітин кишечнику лінії Intestine 407 і моношарів клітин аденокарциноми ободової кишки лінії GPC-16 морських свиней для культивування в стандартних колбах для культури тканини.

Зокрема *L. intracellularis* можна культивувати відомими в даній галузі методами, переважно описаними в US 5714375 і 5885823. Можна, наприклад, спочатку інокулювати культуру клітин за допомогою інокуляту, що містить бактерії *L. intracellularis*, таким чином, щоб інфікувати клітини бактеріями. Для втілення винаходу на практиці можна застосовувати багато ліній клітин, включаючи (але, не обмежуючись ними) шурячі епітеліальні клітини кишечнику лінії IEC-18 (ATCC 1589), клітини людської епідермоїдної карциноми лінії Her-2 (ATCC 23), мишині (неспецифічні) клітини лінії McCoys (ATCC 1696), клітини нирки зеленої мавпи буфало лінії BGMK (Biowhittaker № 71-176) і епітеліальні клітини кишечнику свині. Переважними культурами клітин є клітини лінії Her-2, McCoys або IEC-18.

Якщо застосовують культуру клітин, то перед інокуляцією клітини можуть знаходитися у формі моношару. Для формування моношару клітини можна висівати у звичайні колби. У кожному колбу, як правило, висівають від приблизно  $1 \times 10^5$  до приблизно  $10 \times 10^5$  клітин на колбу площею 25, 75, 150, 850 см<sup>2</sup> або ролерний флакон у суміші із середовищем для росту. Середовища для росту можуть являти собою будь-які середовища для культивування клітин, які містять джерело азоту, необхідні фактори росту для розглянутих клітинних культур і джерело вуглецю, таке як глюкоза або лактоза. Переважним середовищем є середовище DMEM, доповнене середовищем Хема F12 і 1-5% фетальної телячої сироватки, хоча можна використовувати також інші середовища, які надходять у продаж, одержуючи при цьому хороші результати.

Поліпшення культивування *L. intracellularis* досягають шляхом підтримання культури клітин на стадії постійного росту. Тому конфлюентність моношару культури клітин у момент інокуляції пови-

нна становити від приблизно 20 до приблизно 50%. Переважно конфлюентність клітин у момент інокуляції повинна становити від приблизно 30 до приблизно 40%, найбільш переважно приблизно 30%.

В альтернативному варіанті клітини перед здійсненням інокуляції можна вирощувати в суспензії, як це описано нижче. Переважно клітини спочатку вирощують до досягнення 100%-ої конфлюентності у формі моношару в системі адгезійного типу, наприклад у системі з використанням ролерних флаконів, а потім переносять і вирощують у суспензії об'ємом 3-3000 л.

Як інокулят можна застосовувати культуру *L. intracellularis*, отриману від інфікованих свиней або інших тварин.

Інокулят може являти собою кишковий гомогенат, отриманий шляхом зіскрібування слизової оболонки клубової кишки свині або іншої тварини, зараженої ПЕС. Коли готують кишковий гомогенат, зрізи клубової кишки, вибрані для одержання культури, повинні мати серйозні ушкодження, які характеризуються значним потовщенням кишки. Внаслідок недовговічності бактерій зразки після здійснення аутопсії переважно слід якнайшвидше поміщати на зберігання при -70°C. До інокуляту додають антибіотик, до якого *L. intracellularis* має стійкість, такий як ванкоміцин, амфотерицин В або представник антибіотиків, що несуть аміноглікозидну групу, включаючи вказані як приклад гентаміцин і неоміцин, для пригнічення забруднюючих бактерій при збереженні росту *L. intracellularis*. Незалежно від того, чи є інокулят чистою культурою або кишковим гомогенатом, інокуляцію клітинних культур можна здійснювати різними методами, відомими в даній галузі, з використанням вказівок, наведених у даному описі.

Потім бактерії й/або інокульовані клітинні культури інкубують при зниженій концентрації розчиненого O<sub>2</sub>. При концентрації розчиненого кисню вище 10% ріст *L. intracellularis* відбувається з меншою швидкістю в порівнянні з оптимальною, причому зрештою припиняється, коли концентрація кисню виходить із вказаного діапазону. Переважно бактерії й/або інокульовані клітинні культури інкубують при концентрації розчиненого кисню, що становить від приблизно 0 до приблизно 10%. Більш переважно бактерії й/або клітини інкубують при концентрації кисню, що становить від приблизно 0 до приблизно 8%, причому найбільш переважною є концентрація кисню від приблизно 0 до приблизно 3,0%.

Оптимальна концентрація діоксиду вуглецю також є важливою для оптимальної о росту *L. intracellularis*. При концентрації діоксиду вуглецю вище 0 і нижче 4% відбувається ріст, який не відповідає оптимальному, причому ріст зрештою припиняється, коли концентрація діоксиду вуглецю виходить із вказаного діапазону. Переважно концентрація діоксиду вуглецю становить від приблизно 6 до приблизно 10%, причому найбільш переважною є концентрація діоксиду вуглецю приблизно 8,8%.

Крім того, клітини переважно інкубують при концентрації водню, що становить від приблизно 73 до приблизно 96%. Можна застосовувати азот для заміни частини або всього присутнього водню. Найбільш переважно клітини інкубують при концентрації  $O_2$  від приблизно 0 до приблизно 8,0%, концентрації  $CO_2$  приблизно 8,8% і концентрації  $H_2$  приблизно 83,2%.

Інокульовані клітини можна інкубувати у подвійному газовому інкубаторі або інших газових камерах, які містять необхідні концентрації водню, кисню й діоксиду вуглецю і які дозволяють підтримувати клітини в суспендованому стані в процесі інкубації. Камера повинна мати пристрій для підтримання інокульованих клітин у суспензії й газовий монітор і джерело живлення для подачі й підтримання необхідних концентрацій газу. Температура інкубації повинна становити від 30 до приблизно 45°C і більш переважно від приблизно 36 до приблизно 38°C. Найбільш переважно температура становить приблизно 37°C. Необхідне обладнання для культивування й ослаблення вірулентності мікроорганізмів добре відомо й доступно фахівцям у даній галузі й воно вказано в даному описі. Одним із прикладів устаткування, придатного для здійснення даного винаходу, є подвійний газовий інкубатор, наприклад модель 480 (Lab-Line, Мелрозе Парк, шт. Іллінойс) у сполученні з обертовими колбами для підтримання клітин у суспензії. Переважно згідно із даним винаходом обладнання включає ферментер, біореактор, шейкер із перемішувальною пластиною або роторний шейкер, які містять середовища і здатні підтримувати клітинну культуру в суспензії за допомогою продування газом відповідної концентрації або за допомогою інших засобів механічного перемішування, і які дозволяють здійснювати безперервний моніторинг рівнів розчиненого  $O_2$  у середовищах. Фірма New Brunswick, Braun і інші компанії виготовляють придатні для цієї мети ферментери й біореактори.

Максимального росту клітин і отже *L. intracellularis* досягають шляхом підтримання інокульованих клітин у суспендованому стані в процесі інкубації за рахунок збільшення контакту окремих клітин з живильним середовищем й в присутності необхідної суміші водню, кисню й діоксиду вуглецю. Клітинні культури можна перемішувати й підтримувати в суспензії різнотипними методами, відомими в даній галузі, з використанням, наприклад, колб для культур, ролер-флаконів, мембранних культур, біоконтейнерів, біореакторних систем WAVE™ і обертових колб. Клітини можна підтримувати в суспензії в процесі інкубації шляхом інкубації клітин в обертовій колбі всередині подвійного газового інкубатора або аналогічного пристрою. Поняття «обертова колба», у контексті даного винаходу означає колбу або інший контейнер, у якому для перемішування культури й підтримання її в суспензії використовується лопатова мішалка, пропелерна мішалка або інші засоби.

В альтернативному варіанті здійснення винаходу інокульовані клітини інкубують до досягнення конфлюентності клітин, і потім клітини поміщають

в обертову колбу, що містить живильні середовища й інкубують у подвійному газовому інкубаторі при обертанні колби. Переважно інокульовані клітини зскрібають або трипсинізують і пересівають в обертову колбу. Це можна здійснювати різними методами, відомими в даній галузі, наприклад, з використанням скребка для клітин для відділення клітин. Після внесення клітин в обертову колбу лопать обертової колби, як правило, обертається зі швидкістю від приблизно 30 до приблизно 60 об/хв на магнітній перемішувальній пластині для підтримання інфікованих клітин у суспензії.

Потім частину культивованих *L. intracellularis* пересівають на свіжу культуру для збільшення виробництва бактерій *L. intracellularis*. Поняття «пересівання» або його варіанти в контексті даного опису означає процес переносу частини культивованих *L. intracellularis* на свіжі клітинні культури для здійснення зараження свіжих клітин бактерією. Поняття «свіжий», у контексті даного опису означає клітини, які ще не були заражені *L. intracellularis*. Переважно вік таких клітин у середньому становить не більше приблизно одного дня.

Пересівання *L. intracellularis* у суспензійних культурах можна здійснювати шляхом вилучення частини вихідної культури й внесення її в нову колбу, що містить свіжу культуру клітин. Якщо вихідна культура має велику кількість бактерій/мл, наприклад, більше приблизно  $10^4$  бактерій/мл, її переважно додають із зараженої колби в кількості від приблизно 1 до 10 об.% культури стосовно культури свіжих клітин, що знаходяться у новій колбі. Це переважно здійснюють, коли заражено 50-100% клітин. Якщо заражено менше 50% клітин, то пересівання переважно здійснюють шляхом розділення культури в співвідношенні 1:2 у новій колбі й збільшення об'єму за допомогою додавання свіжих середовищ. У будь-якому випадку на відміну від пересівання моношарових культур, відомого з існуючого рівня техніки не потрібно здійснювати лізис клітин і інші стадії.

Після досягнення достатнього збільшення культури клітин і наступного зараження *L. intracellularis*, що визначають за допомогою фарбування відповідно до методу непрямої імуофлуоресценції (антитіл) (IFA), оцінки значення TCID<sub>50</sub> або за допомогою будь-якого порівняльного методу, збирають принаймні частину культивованих бактерій *L. intracellularis*. Стадію збору можна здійснювати шляхом відділення бактерій від суспензії за допомогою різних методів, відомих звичайним фахівцям у даній галузі, з використанням вказівок, наведених у даному описі. Переважно бактерії *L. intracellularis* збирають шляхом центрифугування всього вмісту або частини суспензії з утворенням дебрису клітинної культури, ресуспендування утворених дебрисів і лізису інфікованих клітин. Як правило, принаймні частину вмісту центрифугують приблизно при 3000×g протягом приблизно 20 хв. для того, щоб одержати дебрис клітин і бактерій. Потім дебрис можна ресуспендувати, наприклад у сахарозо-фосфат-глутаматному (СФГ) розчині, і пропускати приблизно 20 разів через голку 25-ого розміру для здійснення лізису клітин. Якщо потрібне додаткове очищення, то зразки можна центри-

фугувати приблизно при 145×g протягом приблизно п'яти хвилин для видалення клітинних ядер і дебрису. Потім супернатант можна центрифугувати приблизно при 3000×g протягом приблизно двадцяти хвилин і утворений дебрис ресуспендувати у відповідному розріджувачі, такому як СФГ, доповненому фетальною бичачою сироваткою (щоб зробити зібрані бактерії придатними для ліофілізації, заморожування або використання як інокуляту), або в живильних середовищах (щоб зробити зібрані бактерії більш придатними для пересівання на свіжі клітини).

Як вказувалося раніше, ефективний ріст *L. intracellularis* для напівпромислового виробництва підсилюють шляхом підтримання активного росту тканинних клітин. Використання суспензійних культур значно полегшує підтримання активного росту клітин і дозволяє здійснювати безперервне збільшення об'єму культури й підвищення масштабу виробництва. При використанні ферментера й концентрації розчиненого  $O_2$  приблизно від 0 до 3%, як це вказано вище, виявляється можливим досягати концентрації аж до  $10^8$  бактерій/мл.

Коли використовують клітини лінії McCoys або IEC-18, то поряд з живильними середовищами переважно додають желатин, агарозу, колаген, акриламід або кремнієві гранули, такі як пористі мікроносії типу Cultisphere-G (фірма HyClone Laboratories, Логан, шт. Юта). Однак для клітин лінії HEp-2 і інших ліній клітин не потрібні мікроносії при використанні способів, запропонованих у винаході.

При використанні культур клітин лінії HEp-2 для підтримання культури переважно 25-50% культури з тижневими інтервалами видалюють і заміняють свіжими середовищами. Для клітинних культур з мікроносіями або гранулами переважно видалюють 25 - 50% культури й заміняють свіжими середовищами 1-2 рази на тиждень. Для підвищення масштабу виробництва до культури можна додатково додавати 25 - 50% середовищ або середовищ із мікроносіями.

Залежно від швидкості, з якою відбувається зараження культури клітин, пересівання на свіжі клітини, як правило, здійснюють із інтервалом часу від приблизно 2 до приблизно 7 днів. Беручи до уваги, що культура клітин стає зараженою принаймні на 70% протягом 2-7 днів, пересівання переважно здійснюють приблизно через кожні 5-7 днів.

Діагностику антигену *L. intracellularis* здійснюють у цей час за допомогою прямого методу імунофлуоресценції й ПЛР. Діагностику антитіл, специфічних у відношенні *L. intracellularis*, у цей час здійснюють із використанням імунофлуоресценції. Ці методи є трудомістких і потребують більших витрат часу, і вони не придатні для великомасштабного скринінгу.

Ефективна діагностика ПЕС утрудняється також внаслідок значного часу, який потрібен для культивування бактерій-збудників. Зараз на основі результатів даного винаходу можна розробляти діагностичні засоби, які дозволяють здійснювати швидкі й точні аналізи присутності *L. intracellularis* у біологічних зразках, взятих з організму свині або інших тварин, чутливих до ПЕС.

Таким чином, в основу даного винаходу була покладена задача розробити вдосконалені способи діагностики захворювання, яке викликається *L. intracellularis*.

Даний винахід належить до галузі ветеринарії й насамперед стосується *Lawsonia intracellularis*. Зокрема винахід стосується способу діагностики інфекції, яка викликається *Lawsonia intracellularis*, і діагностичного тест-набору з використанням специфічних для *Lawsonia intracellularis* антитіл. Винахід стосується також застосування способу або діагностичного тест-набору для діагностики інфекцій, які викликаються *Lawsonia intracellularis*.

На кресленнях показано:

на Фіг.1 - результати, отримані за допомогою блокуючого ELISA, запропонованого у винаході;

на Фіг.2 - порівняння результатів, отриманих методом ІФА й ELISA для 301 зразка сироватки, отриманої в польових умовах;

на Фіг.3 - результати крос-секційних скринінгів (скринінгів з використанням даних, отриманих для різних об'єктів) з використанням блокуючого ELISA, отримані на 3 фермах, заражених ілеїтом;

на Фіг.4 - результати, отримані за допомогою ELISA, на 22 заражених ілеїтом німецьких фермах;

на Фіг.5 - кореляція результатів, отриманих за допомогою ELISA, із клінічними симптомами.

Перед викладом варіантів здійснення даного винаходу необхідно відзначити, що в контексті даного опису й доданий формулі винаходу поняття, які вживаються в однині, включають також і множину, якщо в контексті ясно не вказане інше. Так, наприклад, поняття «бактерія» включає множину таких бактерій, поняття «клітина» включає одну або більшу кількість клітин і їх еквівалентів, відомих фахівцям у даній галузі, і т.д. Якщо не вказано інше, всі технічні й наукові терміни, які використовуються в даному описі, мають значення, загальноприйняті в галузі техніки, до якої належить винахід. Хоча при втіленні на практиці або при тестуванні даного винаходу можна застосовувати будь-які методи й матеріали, аналогічні або еквівалентні до вказаних у даному описі, у даному описі представлені переважні методи, пристрої й матеріали. Всі вказані в описі публікації включені в даний опис як посилання для мети опису й розкриття клітинних ліній, векторів і методологій, представлених у публікаціях, які можна застосовувати відповідно до винаходу. У даному описі ніщо не слід тлумачитися як визнання того, що у винаході не вказані такі документи, отримані заднім числом, як прототипи винаходу.

У контексті даного опису поняття «*L. intracellularis*» означає внутрішньоклітинні вигнуті грамнегативні бактерії, докладно описані в Gebhart і ін.. Int'l. J. of Systemic Bacteriology, том. 43 (3), 1993, стор. 533-538 і S. McOristi і ін., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, том 45 (4), 1995, стор. 820-825, кожна публікація включена в даний опис як посилання у всій повноті; бактерії-збудники, які можна одержувати із зараженої ПЕС свині або інших тварин, що живуть в усьому світі, на основі знань у даній галузі й вказівок, наведених у даному описі; і варіанти або мутанти будь-яких із вказаних вище бактерій, отримані спонтанно або штучним шляхом, і ДНК,

РНК і бактеріальні білки, специфічні для *L. intracellularis*, включаючи білки, експресовані у векторах або після введення *in vivo*, а також фрагменти або антигенні похідні *L. intracellularis*. Це поняття включає також адаптовані ізоляти й ослаблені ізоляти, які описані нижче.

У контексті даного опису поняття «адаптований ізолят» означає будь-який ізолят *L. intracellularis*, отриманий за допомогою методів культивування й пересівання в культурі клітин або будь-яких інших методів, наведених у даному описі, для реплікації *L. intracellularis* з метою одержання антигену.

У контексті даного опису поняття «ослаблений ізолят» означає будь-який ізолят *L. intracellularis*, отриманий за допомогою методів культивування й пересівання, наведених у даному описі, для досягнення авірулентності при збереженні імуногенних властивостей при введенні тварині-хазяїнові.

У контексті даного винаходу поняття «напів-промислове культивування» означає рівень культивування *L. intracellularis*, що перевищує приблизно 2,0 -3,0л і включає виробництво в масштабі 100л або більше. «Культивування» у контексті даного опису означає процес стимуляції росту, репродукції й/або проліферації *L. intracellularis*.

Рішення вказаних вище технічних задач досягається за допомогою даного опису й варіантів здійснення, представлених у формулі винаходу.

Задачею даного винаходу є розробити спосіб діагностики преклінічного або клінічного зараження *L. intracellularis*. Крім того, задачею було розробити способи виявлення імунної відповіді на *L. intracellularis* і засіб для виявлення епідеміології *L. intracellularis*.

Ця задача вирішується згідно із даним винаходом за допомогою способу діагностики преклінічного або клінічного захворювання, яке викликається *L. intracellularis*, представленого в описі й формулі винаходу.

Винахід стосується також виявлення антитіл до *L. intracellularis* і виявлення самої *L. intracellularis*. До таких антитіл належать антитіла будь-якого типу, відомі фахівцям в даній галузі, зокрема імуноглобуліни, які включають підтипи IgA, розчинний IgA, IgM, IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), а також IgD, IgE.

Для виявлення антитіл, специфічних у відношенні *L. intracellularis*, спосіб, запропонований у винаході, полягає в тому, що

а) беруть рідкий зразок (зразок рідини) з організму ссавця

б) виявляють специфічне зв'язування цього рідкого зразка з антигеном *L. intracellularis*

в) порівнюють отриманий результат з контролем.

Як вказано вище, поняття *L. intracellularis* стосується також фрагментів або антигенних похідних *L. intracellularis*, які можна застосовувати відповідно до описаного вище способу.

Аналогічно до цього для виявлення *L. intracellularis*, спосіб, запропонований у винаході, полягає в тому, що

а) беруть рідкий зразок з організму ссавця

б) виявляють специфічне зв'язування цього рідкого зразка з антитілами до *L. intracellularis*

в) порівнюють отриманий результат з контролем.

Рідкий зразок може являти собою будь-яку рідину, яка міститься в організмі, включаючи слину, піт, сечу, кров, секрет, виділення або зразки інших рідин, які містяться в організмі, які відомі експертові в даній галузі. У переважному варіанті здійснення винаходу рідкий зразок збирають із використанням або контейнера для збору (для сечі або іншої рідини), шприца/пробірки для збору (для крові), або певного типу тампона для збору (для слини, поту й т.д.). Переважно, якщо зразок, вказаний на стадії а), являє собою кров, то із цього зразка виділяють сироватку або плазму й стадію б) здійснюють із використанням сироватки або плазми замість рідкого зразка. Потім здійснюють стадію в) як описано вище.

У переважному варіанті здійснення винаходу спосіб полягає в проведенні імунного аналізу. В імунному аналізі використовують моноклональні антитіла або поліклональну антисироватку, специфічну для *L. intracellularis*. В імунних аналізах, запропонованих у винаході, застосовують методи виявлення, відомі в даній галузі, такі як ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз) або так званий сендвіч-ELISA, дот-блотинги, імуноблотинги, радіоімунні тести (радіоімунні аналізи (RIA)), заснований на оцінці дифузії аналіз за методом Оухтерлоні або реактивні імунофлуоресцентні аналізи. Іншими імунними аналізами є тест на основі непрямого або прямого імунофлуоресцентного методу (з використанням антитіл) (ІФА). Ще одним імунним аналізом є так званий Вестерн блот (також називається методом Вестерн-переносу або Вестерн-блотингом). Вестерн-блот дозволяє переносити білки або поліпептиди, розділені за допомогою гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі, на нітроцелюлозний фільтр або інший придатний носій і в той же час зберігати відносні положення білків або поліпептидів, отриманих за допомогою гель-електрофорезу. Потім Вестерн-блот інкубують з антитілом, яке специфічно зв'язується з розглянутим білком або поліпептидом. Ці методи виявлення звичайні фахівці можуть застосовувати для здійснення на практиці описаного винаходу. Нижче дані літературні посилання, у яких фахівець може знайти описи вказаних вище методів і інших методів виявлення: An Introduction to Radioimmunoassay and related techniques, вид-во Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1986; Bullock і ін., Techniques in Immunocytochemistry, вид-во Academic Press, Orlando, F1 том 1 (1982), том 2, 1983, том 3 (1985); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, вид-во Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1985. Як інші імунні аналізи, які застосовують відповідно до винаходу, можна використовувати технології на основі твердих і рідких білкових чіпів або технології на основі мікроматриць із застосуванням мічених або немічених реагентів. Такі аналізи описані, наприклад, в Kozak K. R. і ін., Identification of biomarkers for ovar-

ian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 14, 100(21), жовтень 2003, стор. 12343-12348, або в Fulton R. J. і ін., Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system, Clinical Chemistry, 43(9), 1997, стор. 1749-1756.

Винахід стосується також діагностичного тест-набору для виявлення інфекції, яка викликається *L. intracellularis*, що містить всі елементи, необхідні для здійснення на практиці описаного вище способу діагностики преклінічного або клінічного захворювання, яке викликається *L. intracellularis*.

Крім того, винахід стосується, зокрема, діагностичного тест-набору, який містить антитіла, специфічні для *L. intracellularis*.

Крім того, винахід стосується, зокрема, діагностичного тест-набору, який відрізняється тим, що антитіла, запропоновані у винаході, є поліклональними.

Крім того, винахід стосується, зокрема, діагностичного тест-набору, який відрізняється тим, що антитіла, запропоновані у винаході, є моноклональними.

Діагностичний тест-набір являє собою набір всіх компонентів, необхідних для здійснення способу діагностики, запропонованого у винаході. Конкретними прикладами (перелік не є вичерпним) інших компонентів, необхідних для здійснення способу діагностики, запропонованого у винаході, є контейнери, такі як 96-лункові планшети або титраційні мікропланшети, лабораторні пробірки, інші придатні контейнери, поверхні й субстрати, мембрани, такі як нітроцелюлозний фільтр, реагенти для відмивання й буфери. Діагностичний тест-набір може містити також реагенти, які дозволяють виявляти зв'язані антитіла, такі, наприклад, як мічені «вторинні» антитіла, хромофори, ферменти (наприклад, кон'юговані з антитілами) і їх субстрати або інші субстанції, які мають здатність зв'язуватися з антитілами.

Представлені в даному описі або відомі в даній галузі бактерії *L. intracellularis* або компоненти, отримані з таких бактерій, можна застосовувати як антиген при проведенні ELISA або іншого імунного аналізу, такого як імунофлуоресцентний метод («ІФА»), для виявлення антитіл до *L. intracellularis* у сироватці або іншій загальній воді організму тварин, у відношенні яких є припущення, що вони заражені бактеріями. У цей час переважним методом аналізу є ІФА, описаний нижче в прикладі. В альтернативному варіанті бактерії, запропоновані в даному винаході, можна аналізувати за допомогою Вестерн-блотингу.

Переважним протоколом Вестерн-блотингу є наступний протокол:

1. Здійснюють електрофорез антигену на ДСН-ПААГ, переважно 12% ДСН-ПААГ, і переносять на нітроцелюлозну мембрану.

2. Поміщають мембрану в блокуючий буфер на 2 год.

3. Видаляють блокуючий буфер і промивають 3ФР протягом 1хв.

4. Розводять сироватку блокуючим буфером і наносять на мембрану. Інкують протягом 2год. при кімнатній температурі.

5. Відмивають 3 рази буфером для відмивання (5хв. для кожного відмивання).

6. Розводять кон'юговане специфічне для *L. intracellularis* антитіло, переважно моноклональне антитіло блокуючим буфером і наносять на мембрану. Інкують протягом 1год. при кімнатній температурі.

7. Відмивають 3 рази буфером для відмивання.

8. Додають субстрат на 10хв. або доти, поки не виникає виражений бендінг.

9. Відмивають за допомогою 3ФР.

10. Сушать на повітрі й поміщають на зберігання в темряву.

Кон'югат, що зшитий з антитілом, може являти собою, наприклад, фермент, такий як пероксидаза із хрому (HRP) або лужна фосфатаза (AP). В альтернативному варіанті як кон'югат можна застосовувати хромофор або будь-яку іншу субстанцію, яку можна виявляти і яку можна кількісно оцінювати в присутності субстрату.

Відповідно до винаходу найбільш переважним імунним аналізом є ELISA. Найбільш переважно такий ELISA являє собою сендвіч-ELISA (тобто ELISA з використанням захоплення). Такий ELISA має більшу специфічність, оскільки з його допомогою виявляють два антитіла, специфічні для двох різних епітопів на одному антигені. При використанні сендвіч-ELISA титраційні мікропланшети сенсифікують неміченими антитілами. Потім додають як антиген *L. intracellularis*. Після стадії відмивання зв'язаний антиген *L. intracellularis* виявляють за допомогою другого міченого специфічного для *L. intracellularis* антитіла, яке розпізнає інший епітоп *L. intracellularis*.

Прикладом процедури сенсифікації може служити наступна процедура:

Планшети сенсифікують за допомогою неміченого антитіла, наприклад у суміші 10% сахарози/10% нормальної кінської сироватки в dd<sub>2</sub>O, і інкують з антигеном *L. intracellularis*. Потім планшети сушать і запечатують і зберігають при 37°C. В альтернативному варіанті сенсифіковані антитілом планшети поміщають на зберігання, а антиген додають при проведенні ELISA.

Переважним протоколом ELISA, запропонованим у винаході, є наступний протокол (при використанні сенсифікованих антитілом планшетів):

1. Додають антиген у кількості 0,1мл/лунку, розведений в буфері для сенсифікації. Інкують протягом 18год. при 4°C.

2. Промивають 3 рази 3ФР.

3. У кожен лунку планшета додають 0,25мл блокуючого буфера. Інкують протягом 1 - 2год. при 37°C.

4. Відмивають 3 рази буфером для відмивання.

5. Розводять сироватку блокуючим буфером і додають по 0,1мл у перші лунки планшета. Здійснюють серійні розведення в співвідношенні 1:2 у наступних лунках планшета. Інкують протягом 1год. при 37°C.

6. Відмивають 3-5 разів буфером для відмивання.

7. Розводять кон'юговане специфічне для *L. intracellularis* антитіло блокуючим буфером і додають по 0,1мл у лунки планшета й інкубують протягом 1год. при 37°C.

8. Відмивають 3-5 разів буфером для відмивання.

9. Додають субстрат.

10. Вимірюють абсорбцію світла за допомогою спектрофотометра.

11. Лунки, у які не додавали антиген, використовують як контроль.

12. У кожному тесті слід використовувати також свинячу сироватку як позитивний й негативний контроль.

Переважає ELISA здійснюють у такий спосіб:

Планшети сенсibiliзують за допомогою немиченого антитіла, наприклад у суміші 10% сахарози/10% нормальної кінської сироватки в dd<sub>2</sub>O, і інкубують з антигеном *Lawsonia intracellularis*. Потім планшети сушать і запечатують і зберігають при 37°C.

1. Додають по 90мкл буфера в усі лунки.

2. Додають по 10мкл сироватки в обрані лунки.

3. Інкубують планшет протягом 1год. при 37°C.

4. Відмивають планшет 3 рази ЗФРН (ЗФР-твін)

5. Додають кон'юговане з HRP специфічне антитіло до *L. intracellularis*, переважно моноклональне антитіло, розведене в CDS-C (стандартний буфер для ліофілізації кон'югатів)+0,5M NaCl, 100мкл/лунку.

6. Інкубують протягом 1год. при 37°C.

7. Відмивають планшет 3 рази ЗФРН.

8. Додають субстрат з розрахунку 100мкл/лунку й інкубують при кімнатній температурі протягом 10хв.

9. Додають по 50мкл/лунку стоп-розчину для припинення реакції.

10. Зчитують планшет при 450nm у спектрофотометрі.

Найбільш переважним протоколом сендвіч-ELISA, запропонованим у винаході, є наступний протокол:

1. Додають по 0,1мл/лунку МАт, розведеного в буфері для сенсibiliзації. Інкубують протягом 18год. при 4°C.

2. Відмивають 3 рази ЗФР.

3. Додають по 0,1 мл/лунку антигену, розведеного в буфері, у кожен лунку планшета. Інкубують протягом 1-2год. при 37°C.

4. Відмивають 3 рази буфером для відмивання й/або безпосередньо додають у кожен лунку планшета по 0,25мл блокуючого буфера. Інкубують протягом 1-2год. при 37°C.

5. Відмивають 3 рази буфером для відмивання.

6. Розводять сироватку блокуючим буфером і додають по 0,1мл у перші лунки планшета. Здійснюють серійні розведення в співвідношенні 1:2 у наступних лунках планшета. Інкубують протягом 1год. при 37°C.

7. Відмивають 3-5 разів буфером для відмивання.

8. Розводять кон'юговане специфічне антитіло до *L. intracellularis*, переважно моноклональне антитіло, блокуючим буфером і додають по 0,1мл у лунки планшета й інкубують протягом 1год. при 37°C.

9. Відмивають 3-5 разів буфером для відмивання.

10. Додають субстрат.

11. Вимірюють абсорбцію світла за допомогою спектрофотометра.

12. Лунки, у які не додавали антиген, використовують як контроль.

13. У кожному тесті слід використовувати також свинячу сироватку як позитивний й негативний контроль.

Застосовуваний згідно із даним описом антиген являє собою *L. intracellularis*, як вказано вище. МАт являє собою моноклональне антитіло, специфічне для *L. intracellularis*. Переважає таке антитіло являє собою описане нижче антитіло.

При створенні винаходу несподівано були створені антитіла, що мають високу активність, які можна застосовувати в ELISA відповідно до винаходу. Антитілам для зручності здійснення посилань присвоїли наступні номери: 301:39, 287:6, 268:29, 110:9, 113:2 і 268:18. Всі антитіла мають специфічність відносно антигенів бактерій *L. intracellularis*. Як іммобілізовані антитіла в сендвіч-ELISA застосовують 110:9, 113:2 або 268:18, а як кон'югованих антитіл застосовують 268:18, 268:29 або 287:6. Найбільш переважним іммобілізованим антитілом є антитіло 110:9, а кон'югованим антитілом є антитіло 268:29. Переважними є також антитіла, які мають всі характеристики вказаних вище антитіл, що означає, що вони мають практично такі ж характеристики зв'язування, які властиві вказаним вище антитілам, і/або які спрямовані на ті ж самі антигени *L. intracellularis*, які вказані вище, і/або спрямовані або розпізнають ті ж самі епітопи, що й вказані вище антитіла.

Антитіла, запропоновані у винаході, продукуються клітинами гібридами. Клітини гібридом, запропонованих у винаході, депоновані з метою патентування відповідно до Будапештського договору в Науково-виробничому центрі мікробіології (CAMR) і Європейської колекції клітинних культур (ECACC), Солсбері, Уілтшир SP4 0JG, Великобританія. Дата депонування - 11 травня 2004. Лінія клітин гібридами 110:9 успішно депонована під реєстраційним номером ECACC 04092204. Лінія клітин гібридами 113:2 успішно депонована під реєстраційним номером ECACC 04092201. Лінія клітин гібридами 268:18 успішно депонована під реєстраційним номером ECACC 04092202. Лінія клітин гібридами 268:29 успішно депонована під реєстраційним номером ECACC 04092206. Лінія клітин гібридами 287:6 успішно депонована під реєстраційним номером ECACC 04092203. Лінія клітин гібридами 301:39 успішно депонована під реєстраційним номером ECACC 04092205.

Нижче винахід більш докладно проілюстрований на прикладах, які представлені тільки з метою

ілюстрації й не спрямовані на обмеження обсягу винаходу. Зокрема, звичайному фахівцеві в даній галузі повинні бути очевидні інші варіанти здійснення винаходу.

Всі процитовані в даному описі публікації й патенти включені в опис як посилання повністю.

#### Приклад 1

##### 1.0 Матеріал

клітинна лінія гібридами, яка секретує антитіла до Lawsonia: 372:13,113:2, 268:18, 287:6, 110:9, 268:29, 301:39.

Устаткування й середовища для культивування клітин гібридами.

Устаткування й буфери для очищення й кон'югації з HRP моноклональних антитіл (МАт).

Устаткування й розчини для ELISA.

Антиген Lawsonia SF1289 N343 12/20/00

Позитивна у відношенні Lawsonia сироватка: лот № 052902pig № 26 (інфікований експериментально), лот № 052902pig № 69 (вакцинований)

Негативна у відношенні Lawsonia сироватка: р 25.8 № 273 день 52 6-30-95, 116705.

##### 1.1. Методи

Одержання моноклональних антитіл здійснювали відповідно до стандартних методів на фірмі Svanova Biotech.

1.1.1. Культивування клітин гібридами й одержання кон'югованих з HRP моноклональних антитіл.

- Для збереження ліній клітин гібридами відбирали по 15 пробірок для кожної лінії й поміщали на зберігання при -135°C.

- Одну пробірку для кожної лінії клітин гібридами піддавали розморожуванню й клітини вирощували в колбах для клітинних культур.

- Для кожної лінії клітин очищали від 500 до 1000мл супернатанту й піддавали кон'югації з пероксидазою із хрому.

	МАт					
сироватка	301:39	110:9	268:29	287:6	113:2	268:18
№26						
експ.	57	45	78	74	42	72
+						
№69						
вакц.	18	23	52	43	45	25
+						
25.8№273						
-	7	3	27	20	14	21
116705						
-	-7	-9	-24	-13	18	-19

##### 1.3. Обговорення

Результати даного дослідження ясно свідчать про те, що одне або декілька тестованих моноклональних антитіл придатні для аналізу за допомогою блокуючого ELISA з використанням Lawsonia intracellularis. При використанні МАт 268:29, 287:6 і 268:18 було виявлено істотне відмінності між позитивною й негативною сироваткою, тобто вони є перспективними кандидатами для розробки блокуючого ELISA.

#### Приклад 2

##### 2.0 Короткий опис

##### 1.1.2. Блокуючий ELISA

Очищені й кон'юговані з HRP МАт тестували за допомогою ELISA відносно їх здатності блокуватися позитивною у відношенні Lawsonia свинячою сироваткою.

Планшети для ELISA сенсibiliзували антигеном Lawsonia при розведенні 1/200, 100мкл/лунку.

Свинячу сироватку розводили в співвідношенні 1/10, 100мкл/лунку.

Розводили й додавали кон'юговані з HRP МАт, 100мкл/лунку.

Результати виражали у вигляді відсотка інгібування (BI) відповідно до наступної формули:

$$BI = 1 - (\text{ОГ зразка} / \text{ОГ МАт}) \times 100.$$

##### 1.2 Результати

1.2.1 Культивування клітин гібридами й одержання кон'югованих з HRP моноклональних антитіл.

- Для всіх МАт, крім одного, було проведено успішне очищення й кон'югація з HRP. Вони мали високу здатність утворювати продукт.

- МАт 372:13 мало слабку здатність утворювати продукт. Для цього МАт не вдалося здійснити успішну кон'югацію з HRP і тому його не тестували за допомогою блокуючого ELISA.

##### 1.2.2 Блокуючий ELISA

- В експериментах використовували зразки двох позитивних (№26, №69) і двох негативних (25.8 №273, 116705) сироваток.

- Експериментальна заражена сироватка (№26) інгібувала всі шість кон'югованих з HRP МАт, але в різному ступені. Сироватка з вакцинованих свиней мала істотно меншу інгібуючу здатність.

- Негативна сироватка не мала ніякої або мала дуже слабку інгібуючу здатність.

Результати представлені на наведеній нижче таблиці й на Фіг.1.

Розробка й затвердження прототипу сендвіч-б (блокуючого)-ELISA для виявлення антитіл до Lawsonia intracellularis.

Після розрахунку чутливості й специфічності з використанням імуофлуоресцентного аналізу ІФА як «золотий» стандарт можна зробити наступні висновки:

- Імобілізоване МАт 110:9 дозволяє здійснювати чітке відмінності між позитивними й негативними зразками.

- Ідентифікуюче МАт 268:29-HRP дозволяє чітко визначати відмінності між позитивною й негативною сироваткою.



вною сироваткою із чутливістю й специфічністю, що становить 100%.

Рекомендованим прототипом є наступний:

- МАТ 110:9 у якості іммобілізований МАТ, якою сенсibilізують стрипи (смужки) тину Nunc maxisorp C-8

- Антиген (АГ): культура *Lawsonia intracellularis* (переважно у вигляді концентрованого продукту, що постачається фірмою R&D при BI)

- Зразки сироватки, розведені в співвідношенні 1/10 в 0,5М NaCl/3ФРН. Інкубація протягом 1год. при 37°C.

- Кон'югування з HRP МАТ 268:29, ліофілізоване в CDS-C-буфері, що містить 0,5М NaCl. Інкубація протягом 1год. при 37°C.

- Субстрат K-Blue Max, інкубація протягом 10хв. при кімнатній температурі.

- Стоп-розчин фірми Svanova.

#### 2.1 Матеріали й методи

ELISA здійснювали відповідно до наступної процедури:

##### 2.1.0 Процедура ELISA

- Додають по 90мкл буфера в усі лунки.

- Додають по 10мкл сироватки в обрані лунки.

- Інкують планшет протягом 1год. при 37°C.

- Відмивають планшет 3 рази за допомогою 3ФРН.

- Додають кон'югат HRP з МАТ, розведений CDS-C-буфером + 0,5МNaCl, 100мкл/лунку.

- Інкують планшет протягом 1 год при 37°C.

- Відмивають планшет 3 рази 3ФРН.

- Додають субстрат, по 100мкл/лунку й інкують при кімнатній температурі протягом 10хв.

- Додають 50мкл стоп-розчину/лунку.

- Зчитують планшет при 450nm за допомогою спектрофотометра.

Результати представляли у вигляді 1 - значень ОГ або 2 - BI (відсоток інгібування), тобто 100 - ОГ зразка/ ОГ МАТ × 100

##### 2.1.1 Тест 1 (ELISA 030922, 030923x2)

Стрипи типу 3-8 сенсibilізували МАТ 110:9, 113:2, 301:39, 287:6 з розрахунку 300нг/лунку. Стрипи блокували 10% 2251HAS (нормальна кіньська сироватка), 10% сахарози/H<sub>2</sub>ПРО UHP, 150мкл/лунку, інкубували протягом 30 із при кімнатній температурі.

Аг № 030619 розводили 3ФРН у співвідношенні 1/10, 100мкл/лунку, інкубували протягом 3 год при 4°C.

Стрипи сушили протягом 3 год при 37°C. Зберігали при 4°C.

Сироватка: ІФА-позитивна № 26, № 69. ІФА-негативна: № 6, 31, В1, Е1.

Розведена в співвідношенні 1/10 0,5М NaCl/3ФРН.

Кон'югат: 268:18-, 113:2-, 301:39-, 110:9-, 287:6-, 268:29-HRP, розведені в 0,5М NaCl/3ФРН.

Всі іммобілізовані МАТ тестували шляхом порівняння з усіма кон'югованими з HRP МАТ за винятком них самих.

##### 2.1.2 Тест 2 (ELISA 030924)

Стрипи сенсibilізували за допомогою 110:9, 113:2 і 287:6 відповідно до методу, описаному вище в тесті 1.

Сироватка: ІФА-іозитивна №26, №69. ІФА-негативна: №6, 31, В1, Е1. Розведена в співвідношенні 1/10 0,5М NaCl/3ФРН.

Кон'юговані з HRP МАТ: 268:18, 268:29, 287:6, розведені в 0,5М NaCl/CDS-C (стандартний буфер для ліофілізації кон'югатів, що надходить у продаж від фірми Svanova).

##### 2.1.3 Тест 3 (ELISA 030925)

Стрипи сенсibilізували за допомогою антитіл 110:9, 113:2 і 287:6 відповідно до методу, описаному вище в тесті 1.

Сироватка: тестували 24 сироватки (10 ІФА-позитивних, 10 ІФА-негативних і 4 невизначеної специфічності). Розведення 1/10 в 0,5М NaCl/3ФРН.

Кон'югат: 268:18-HRP, розведений в 0,5М NaCl/CDS-C.

##### 2.1.4 Тест 4 (ELISA 030930, 031002, 031008)

Стрипи, сенсibilізовані антитілом 110:9 відповідно до методу, описаному в тесті 1.

Сироватка: 21 ІФА-позитивна, 69 ІФА-негативних. Розведення 1/10 в 0,5М NaCl/3ФРН.

Кон'югат: 268:18, кон'югований з HRP, розведений в 0,5М NaCl/CDS-C.

#### 2.2. Результати

##### 2.2.1 Тест 1 (ELISA 030922, 030923x2)

Іммобілізовані МАТ 110:9, 113:2 і 287:6 і кон'юговані МАТ 268:18 і 268:29 і 287:6, очевидно, є найбільш перспективними кандидатами для сендвіч-b-ELISA, оскільки ці комбінації мали найбільшу блокуючу здатність при використанні позитивної сироватки. У більшості тестів сироватка №6 була оцінена як позитивна. Це й передбачалося, оскільки ця сироватка була оцінена як позитивна за допомогою розробленого раніше прототипу b-ELISA.

##### 2.2.2 Тест 2 (ELISA 030924)

Цей тест здійснювали в основному для того, щоб пересвідчитися, що можна використовувати стандартний буфер, застосовуваний для ліофілізації кон'югата. Результати свідчать про те, що блокування досягалося при використанні позитивної сироватки. Найбільший блокуючий ефект був виявлений при виявленні за допомогою МАТ 268:18 або 268:29.

##### 2.2.3 Тест 3 (ELISA 030925)

Було встановлено, що іммобілізоване МАТ 110:9 є найбільш переважним, оскільки дозволяє найбільш чітко розрізнити позитивні й негативні зразки.

##### 2.2.4 Тест 4 (ELISA 030930, 031002, 031008)

Отримані значення ОГ і BI наведені в додатку 5. На графіку залежності значень ОГ від отриманих за допомогою ІФА результатів з використанням кон'югованого з HRP МАТ 268:29 видно чіткі відмінності між позитивними й негативними зразками з 100%-ною чутливістю й специфічністю. МАТ 268:18 також володіє 100%-ною чутливістю й специфічністю, але відмінності між позитивними й негативними зразками невеликі. Із графіка, на якому представлені значення BI, видно, що МАТ 268:18 має чутливість 95,7 і специфічність 100% при частоті зрізу 20,9, у той час як МАТ 268:29 має 100%-ну чутливість й специфічність при частоті і зрізу 28,6.

#### 2.3. Обговорення

На основі розрахунку чутливості й специфічності при здійсненні імунофлуоресцентного аналізу ІФА можна зробити наступні висновки:

- Імобілізоване МАт 110:9 є найбільш переважним, оскільки дозволяє чітко розрізняти позитивні й негативні зразки.

- Ідентифікуючий МАт 268:29, кон'юговане з HRP, є найбільш переважним, оскільки дозволяє чітко розрізняти з 100%-ною чутливістю й специфічністю позитивну й негативну сироватку.

Рекомендується застосовувати наступні прототи:

- МАт 110:9 як іммобілізованого МАт 110:9, яким сенсibilізують Nunc maxisorp-стрипи типу C-8

- Аг: культура *Lawsonia intracellularis* (переважно у вигляді концентрованого продукту, що постачається фірмою R&D при BI)

- Зразки сироватки, розведені в співвідношенні 1/10 в 0,5M NaCl/3ФРН. Інкубація протягом 1 год. при 37°C.

- Кон'юговане з HRP МАт 268:29, ліофілізоване в CDS-C-буфері, що містить 0,5M NaCl. Інкубація протягом 1 год. при 37°C.

- Субстрат K-Blue Max, інкубація протягом 10хв. при кімнатній температурі.

- Стоп-розчин фірми Svanova.

Приклад 3

### 3.1. Резюме

Проведені прискорені дослідження стабільності свідчать про те, що антиген *Lawsonia intracellularis*, іммобілізований на планшеті для ELISA, має стабільність принаймні протягом одного року й що антитіло до *Lawsonia*, кон'юговане з HRP 268:29, у ліофілізованій формі має стабільність протягом періоду часу від 6 до 12 місяців.

### 3.2. Введення

Для оцінки стабільності компонентів перспективного ELISA-набору для *Lawsonia intracellularis* були проведені прискорені тести для дослідження стабільності. Призначений для дослідження стабільності компонент зберігали протягом 4 тижнів при 37°C і потім тестували за допомогою ELISA і порівнювали з компонентом, який зберігали при 4°C. Стабільність протягом 4 тижнів при 37°C відповідає строку придатності приблизно 12 місяців. У даному звіті описані прискорені дослідження стабільності, проведені з використанням іммобілізованого антигену на планшеті для ELISA і кон'югата з HRP.

### 3.3. Матеріали й методи

Прискорене дослідження стабільності на планшетах (ELISA 031024)

Планшети сенсibilізували МАт 110:9 до *Lawsonia*, блокували 10% сахарози/нормальної кінської сироватки в dd<sub>2</sub>O і інкубували з антигеном *Lawsonia*. Планшети сушили й запечатували й зберігали при +37°C. Планшети брали після зберігання при +37°C через 1, 2, 3 і 4 тижні й поміщали на зберігання в холодильник. Як контроль зберігали також планшети протягом усього періоду тестування при 4°C.

Для оцінки характеристик сендвіч-ELISA використовували позитивні сироватки №26, №69 і №06 і негативні сироватки 32, D1 і E2.

Використовували кон'юговане з HRP МАт 268:29, лот №030120.

Прискорене дослідження стабільності на ліофілізованому кон'югаті (ELISA 031027)

Кон'юговане з HRP МАт 268:29, лот №030120 розводили в співвідношенні 1/1000 в CDS-C-буфері, розподіляли в скляні флакони й ліофілізували відповідно до стандартних процедур. Чотири флакони с ліофілізованим продуктом зберігали при +37°C протягом 1, 2, 3 і 4 тижнів. Флакони зберігали також при 4°C. Уміст різних флаконів тестували за допомогою сендвіч-ELISA. Як позитивну сироватку використовували №26 і як негативну сироватку використовували сироватку 030926.

Було встановлено, що розведення 1/1000 кон'югованого антитіла («розведення кон'югата») приводить у тесті до занадто більших величин ОГ. Тому кон'юговане антитіло титрували на планшеті для одержання сигналу для тесту, який знаходиться в потрібному діапазоні.

### 3.4. Результати

Прискорене дослідження стабільності на планшетах

Через 1 тиждень було виявлено сильне зменшення величин ОГ у порівнянні з величинами ОГ, отриманим з використанням стрипів, які зберігали при 4°C. Не було виявлено значних відмінностей при порівнянні результатів, отриманих через 1 і 4 тижні.

При аналізі значень BI не було виявлено істотних відмінностей при порівнянні результатів, отриманих у період між 1-им і 4-им тижнем при зберіганні при 4°C.

Прискорене дослідження стабільності ліофілізованого кон'югата

При «розведенні кон'югата» 1/8000 для сироватки №26 було виявлене зменшення від 0,547 до 0,398 через 4 тижні, а для сироватки 030926 зменшення від 1,654 до 0,99 після закінчення 4 тижневого періоду.

### 3.5. Обговорення

Результати проведених досліджень свідчать про те, що планшет для ELISA з *Lawsonia intracellularis* має стабільність принаймні протягом одного року. При використанні антитіла 268:29 до *Lawsonia*, кон'югованого з HRP, виявлене зменшення ОГ на 40% у порівнянні з негативною сироваткою після 4-х тижнів. Це може свідчити про деяку нестабільність кон'югата. При розрахунку величин ОГ зменшення сигналу на 40% відповідає величині 1,5 і величина ОГ 0,9 після закінчення 1 року усе ще знаходиться в прийнятному діапазоні (відповідає критеріям прийнятності).

Приклад 4

### 4.1. Резюме

Перевірку прототипу (партія планшетів 040107) здійснювали шляхом тестування 50 зразків сироватки, які раніше використовували при розробці прототипу. Результати перевірконого дослідження продемонстрували 100%-е виявлення позитивної сироватки, у ті час як у партії, яку пере-

виряють, 2 з 25 зразків негативної сироватки були оцінені як позитивні.

Установлено, що в CDS-C-буфері можна застосовувати нормальну кінську сироватку замість свинячої сироватки, яку використовують зараз.

Було встановлено, що при використанні ЗФРН, що містить 0,042% ПВП, були отримані такі ж результати, що й при використанні ЗФРН-таблеток (які містять ПВП).

#### 4.2. Введення

Для перевірки прототипу сендвіч-ELISA необхідно тестувати більшу кількість зразків сироватки для більшої партії планшетів, приготовлених для напівпромислового виробництва.

Ці дослідження проводили на партії планшетів 040107, які тестували шляхом дослідження 50 зразків сироватки, раніше застосовуваних для створення прототипу.

При ліофілізації кон'югата з HRP як консервант застосовували CDS-C-буфер. Цей буфер містить свинячу сироватку. Оскільки в перспективі може виявитися проблематичним знайти негативну у відношенні *Lawsonia* сироватку, призначену для використання в CDS-C-буфері, то оцінювали інші варіанти. У цьому дослідженні тестували нормальну кінську сироватку й фетальну телячу сироватку.

Основну частину лабораторних досліджень для цього ELISA була проведена з використанням ЗФРН-таблеток. Встановлено, що 20 × ЗФРН, який входить у набори фірми Svanovir, не можна застосовувати, оскільки при цьому тест не дозволяє точно розрізнити позитивні й негативні зразки. При порівнянні складів таблеток і 20 × ЗФРН було встановлено, що всі компоненти були ідентичними за винятком того, що в таблетки як стабілізатор був включений ПВП (полівінілпіролідон K25). У результаті експериментів було встановлено, що при додаванні ПВП в 20 × ЗФРН досягаються такі ж результати, що й для таблеток.

#### 4.3. Матеріали й методи

##### Перевірка прототипу (ELISA 040312)

50 зразків сироваток (отриманих від фірми Bioscreen), які раніше оцінювали при розробці ELISA, застосовуваного як прототип, тестували з використанням великомасштабної партії №0400107 планшетів. Застосовували 20 × ЗФРН, що містить 0,042% ПВП. Застосовували партію 040308 ліофілізованого кон'югата.

CDS-C-буфер, який містить нормальну кінську сироватку.

##### Тест ELISA 040203

CDS-C-буфер одержували з використанням: 1 - свинячої сироватки (згідно TJ4/05F), 2 - нормальні кінські сироватки й 3 - фетальної телячої сироватки. Буфери тестували як буфери для кон'югації в ELISA. Тестовані зразки сироватки являли собою gris 2, 4, 13 і 17, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239, № 26 і 32. Використовували кон'юговане з HRP МАт 268:29, лот №030318. Використовували 20 × ЗФРН-буфер, доповнений 0,042% ПВП.

##### Тест ELISA 040311

CDS-C-буфер, що містить нормальну кінську сироватку, використовували для одержання ліофілізованого кон'югата для двох варіантів досвідів

(040211, 040308). Кон'югат одержували для готування кінцевих розведень 1/20к, 1/25к і 1/30к. Свіжоприготовлені кон'югати тестували паралельно. Використовували сироватку №26, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239, позитивний пул 030926 і негативний пул 030926. Використовували кон'юговане з HRP МАт 268:29, лот №030318. Використовували 20 × ЗФРН-буфер, що містить 0,042% ПВП.

##### ЗФРН, що містить ПВП (ELISA 040301)

20 × ЗФРН буфер розводили в співвідношенні 1/20 і додавали ПВП у кінцевій концентрації 0,042%. Цей буфер тестували паралельно зі ЗФРН-таблетками (які уже містять ПВП) і 20 × ЗФРН-буфером, розведеним у співвідношенні 1/20. Буфери використовували на всіх стадіях, тобто як буфер для зразка й буфера для розведення кон'югата, а також як буфер для відмивання.

Використовували зразки сироватки №26, Е1, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239 і gris 13. Використовували кон'юговане з HRP МАт 268:29, лот №030318. Як буфер для кон'югації використовували CDS-C-буфер зі свинячою сироваткою.

#### 4.4. Результати

##### Перевірка прототипу

Результати свідчать про те, що в партії, призначеній для перевірки, всі 25 позитивні, як встановлено раніше, сироватки були оцінені як позитивні. 2 з 25 сироваток, раніше оцінених як негативні, були оцінені як позитивні.

CDS-C-буфер з нормальною кінською сироваткою

Для буфера, який містить нормальну кінську сироватку, були отримані результати, аналогічні до результатів, отриманих для свинячої сироватки.

Значення ОГ для іммобілізованого з HRP МАт зменшувалися не більше ніж на 0,4 у порівнянні зі свіжоприготовленим кон'югатом. Це зменшення зафіксоване в обох партіях ліофілізованого кон'югата. Це обставина не впливає на ефективність тесту, оскільки розраховані значення ВІ узгоджуються незалежно від отриманих значень ОГ.

##### ЗФРН, що містить ПВП

Дані досліджень свідчать про те, що результати, отримані при використанні 20 × ЗФРН-буфера, розведеного в співвідношенні 1/20, доповненого 0,042%-ним ПВП, аналогічні до результатів, отриманих при використанні ЗФРН-таблеток, у той час як при використанні 20 × ЗФРН-буфера, розведеного в співвідношенні 1/20 без додавання ПВП, були отримані помилкові негативні результати.

#### 4.5. Обговорення

Перевірку прототипу (партія планшетів 040107) здійснювали шляхом тестування 50 зразків сироватки, які використовували раніше при створенні прототипу. Перевірочне дослідження продемонструвало, що для позитивної сироватки оцінка була правильною на 100%, у той час як у партії, яку перевіряють, з 25 негативних сироваток 2 були оцінені як позитивні. «Помилкові» оцінки негативної сироватки є прийнятними, оскільки основний зміст даного тесту полягає у виявленні позитивних зразків. Не доведено також, що результати попереднього тестування дійсно є вірними.

Встановлено, що при використанні ЗФРН, що містить 0,042% ПВП, результати аналогічні до результатів, отриманих при використанні ЗФРН-таблеток (які містять ПВП). Отже перспективні набори повинні містити цей буфер. Для гарантії придатності наборів необхідно здійснювати дослідження стабільності 20 × ЗФРН, що містить ПВП.

#### Приклад 5

##### 5.1 Введення й цілі

Виявлення сироваткових антитіл до *Lawsonia intracellularis* дотепер здійснювали за допомогою ІФА-тестів (1). Ці тести засновані на індивідуальній і найвищою мірою суб'єктивній оцінці результатів. При створенні винаходу розроблений блокуючий сендвіч-ELISA, заснований на застосуванні моноклональних антитіл, які мають високу специфічність до *L. intracellularis*. Дані, отримані за допомогою цього тесту, можна вимірювати й оцінювати об'єктивно, що поліпшує їх відтворюваність, повторюваність і порівняльність.

В даному дослідженні вперше представлені порівняння з даними ІФА-тесту, які демонструють придатність і ефективність нового тесту.

##### 5.2. Матеріали й методи

Антиген *L. intracellularis*, вирощений у культурі клітин лінії McCoу і іммобілізований за допомогою специфічного моноклонального антитіла на титраційних мікропланшетах, використовували для виявлення антитіл до *L. intracellularis* у зразках свинячої сироватки. Сироватку тестували при розведеннях від 1 до 10. Після інкубації протягом 1 год. при 37°C планшети промивали розчином ЗФР-Твін, додавали мічене за допомогою пероксидази із хрому моноклональне антитіло (відмінне від антитіла, яке застосовують як іммобілізоване антитіло). Планшети інкубували протягом ще однієї години при 37°C. Незв'язані антитіла видаляли шляхом відмивання. Після інкубації із ТМБ-субстратом протягом 10 хв. при кімнатній температурі реакцію припиняли шляхом додавання стоп-розчину. Для кожної лунки визначали значення ОГ<sub>450</sub> за допомогою фотометра. Результати розраховували у вигляді відсотка інгібування відносно контролю без додавання сироватки.

Для оцінки нового ELISA використовували 301 зразок сироватки, отриманої в польових умовах, тестовані за допомогою затвердженого ІФА-тесту (2) для визначення антитіл до *L. intracellularis*. Крім того для демонстрації діагностичної ефективності ELISA у порівнянні з ІФА використовували крос-секційні зразки (по 10 зразків з 9 вікових груп), отримані на двох фермах, для яких було відомо, що на них виявлений ілеїт, і на одній фермі, у відношенні якої було припущення про наявність ілеїту.

##### 5.3 Результати

Для великої кількості негативних сироваток були отримані негативні значення інгібування. Тому найменшу вимірювану величину приймали за 0, а всі інші величини співвідносили з нею. Ці дані означали як «відносні величини, отримані за допомогою ELISA (відносні ELISA-значення)».

Результати для 301 зразка сироватки, отриманої в польових умовах, узагальнені на Фіг.2. ELISA дозволяє чітко розрізняти негативну (середнє зна-

чення за даними ELISA 36) і позитивну сироватку (середнє значення за даними ELISA 86). Більшість зразків, які були оцінені як сумнівні за даними ІФА, за даними ELISA виявилися позитивними.

Результати крос-секційного скринінгу, проведеного на 3 фермах, представлені на Фіг.3. Обидва тести дозволяли чітко виявляти антитіла до *L. intracellularis* на тварин 3 фермах.

##### 5.4. Обговорення

У порівнянні з результатами ІФА-тесту ELISA має більш високу чутливість. Для деяких груп з 3 тестованих ферм результати, які були отримані за допомогою ELISA, є набагато більш достовірними, ніж результати ІФА-тесту, які багато в чому є спірними, що обумовлено неспецифічною флуоресценцією. Серологічні профілі для 3 черід знаходяться у хорошій відповідності з опублікованими раніше даними для черід європейських тварин (3,4). Збільшення ELISA-значень, для групи свиней віком 10 і 16 тижнів у порівнянні з результатами, отриманими за допомогою ІФА-тесту, свідчить про те, що сироватка, що характеризується за даними ELISA значеннями більше 55, може бути оцінена як позитивна.

Розглянутий новий тест може дозволити поліпшувати діагноз ілеїту при використанні стандартних зразків. Новий метод виявлення ілеїту за допомогою блокуючого ELISA являє собою швидкий і чутливий метод скринінгу більших кількостей зразків на об'єктивній основі.

##### Посилання

1. Guedes RMC і ін., Can J. Vet. Res., 66, 2002, стор. 99-107
2. Knittel J.P. і ін., AJVR, 59, 1998, стор. 722-726
3. Biksi і ін., Proc. 17<sup>th</sup> IPVS, 2002, Ames, Iowa, USA
4. van Aken N. і ін., 17<sup>th</sup> IPVS, 2002, Ames, Iowa, USA.

#### Приклад 6

##### 6.1 Введення й цілі

Дотепер специфічну діагностику ілеїту здійснювали за допомогою ІФА-тестів для виявлення антитіл (1,2) або за допомогою ПЛР (3,4), гістологічних методів і методів з використанням імунного фарбування (2, 5, 6) для виявлення антигену у фекаліях або зразках тканини кишечника. Всі ці методи мають певні недоліки, зв'язані зі специфічністю, ризиком забруднення або трудомісткістю, і не придатні для проведення великомасштабних стандартних скринінгів череди. Таким чином, основні діагностичні тести здійснюють тільки для декількох свиней із череди. При застосуванні розробленого при створенні даного винаходу блокуючого ELISA серологічне тестування стає більш легким, більш надійним і його можна застосовувати для одержання профілю для цілої череди. Для демонстрації діагностичної ефективності нового тесту були проведені крос-секційні дослідження на 22 фермах у Німеччині.

##### 6.2. Матеріали й методи

Крос-секційні зразки, отримані на 22 фермах Німеччини, тестували за допомогою ELISA. На кожній фермі одержували зразки з організму підсвинків, свиноматок і свиней віком 4, 7, 10, 13, 16,

20 і 24 тижні (по 10 зразків у кожній віковій групі). ELISA здійснювали як описані в прикладі 5.

### 6.3. Результати

На Фіг.4 узагальнені середні відносні дані, отримані за допомогою ELISA, для всіх 22 ферм. Сироватка, отримана від підсвинків і свиноматок, мала високу реактивність при дослідженні за допомогою ELISA, у той час як результати, отримані для млявих поросят 4-10-тижневого віку, були низькими. Для тварин, що знаходяться на відгодівлі, значення, отримані за допомогою ELISA, зростали протягом періоду від 13 до 24 тижнів.

На Фіг.5 наведена кореляція середніх значень, отриманих за допомогою ELISA, із клінічними симптомами, виявленими на фермах. На фермах №5, 6 і 15 у момент узяття зразків не було виявлено ніяких проблем з кишковими захворюваннями, що мають клінічне значення. На фермі 3 у поросят віком від 4 до 13 тижнів були проблеми з кишковим захворюваннями, які були діагностовані як діарея, викликана *E. coli*. На фермі №18 попередні серологічні тести виявили присутність *Lawsonia intracellularis* без клінічних симптомів. На фермах 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 21 і 22 перед взяттям зразків для даного дослідження був виявлений ілеїт. З ферм 4, 13, 14, 16 і 20 надійшли відомості про проблеми з кишковим трактом у молодняку й тварин, що знаходяться на відгодівлі, при цьому на фермах №4 і 13 передбачався клінічний ілеїт. На фермі №17 не виявлено клінічних ознак діареї, але на цій фермі застосовували антибіотики для молодняку й при початку відгодівлі.

### 6.4. Обговорення

Узагальнені профілі сироватки, отримані на 22 фермах, свідчать про високу реактивність свиноматок і підсвинків і про те, що викликається реакція на антитіло, у період, починаючи з 13-тижнів і аж до 24-тижневого віку. Ці дані відповідають опублікованими в цей час даними серологічних дослі-

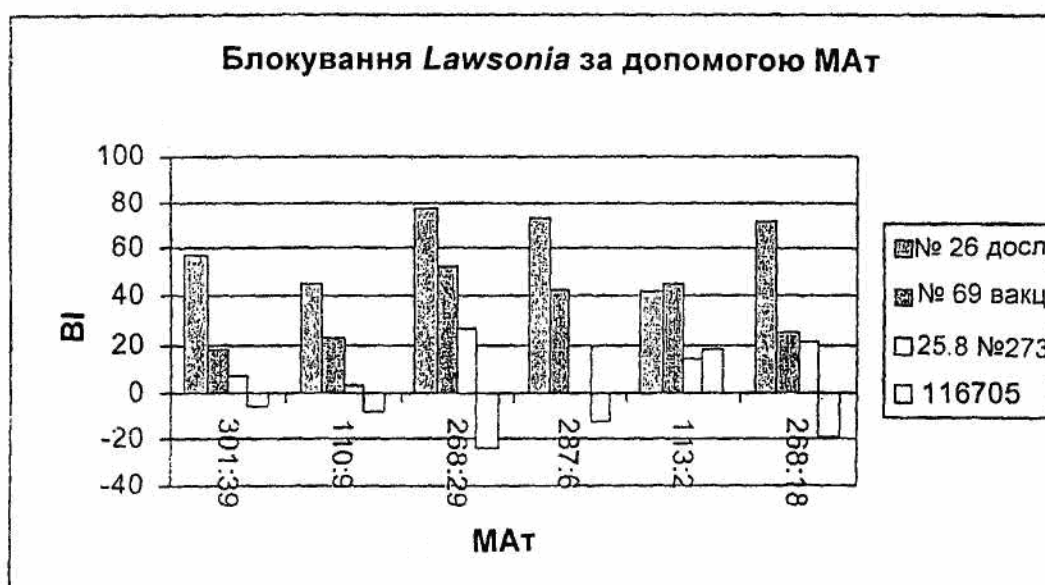
джень, що стосуються ілеїту (7, 8, 9). У свиней, яких містили на фермах, де не було діареї (№ 5, 6, 15 і 18) і на фермі, на якій була виявлена діарея, викликана *E. coli* (№3), за допомогою ELISA не було виявлено істотної сероконверсії. На фермах, де був виявлений ілеїт (№1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 21 і 22) була виявлена істотна сероконверсія в період від 7-й до 13-й тижня.

Представляє інтерес, що зразки, взяті з організму більшості груп свиноматок і підсвинків, мали високу реактивність при оцінці за допомогою ELISA, хоча в більшості із цих свиней не було виявлено проблем, зв'язаних з кишковими захворюваннями. Це може бути обумовлено субклінічним зараженням *Lawsonia intracellularis*. Результати, отримані на фермі №17, очевидно, свідчать про наявність субклінічного ілеїту.

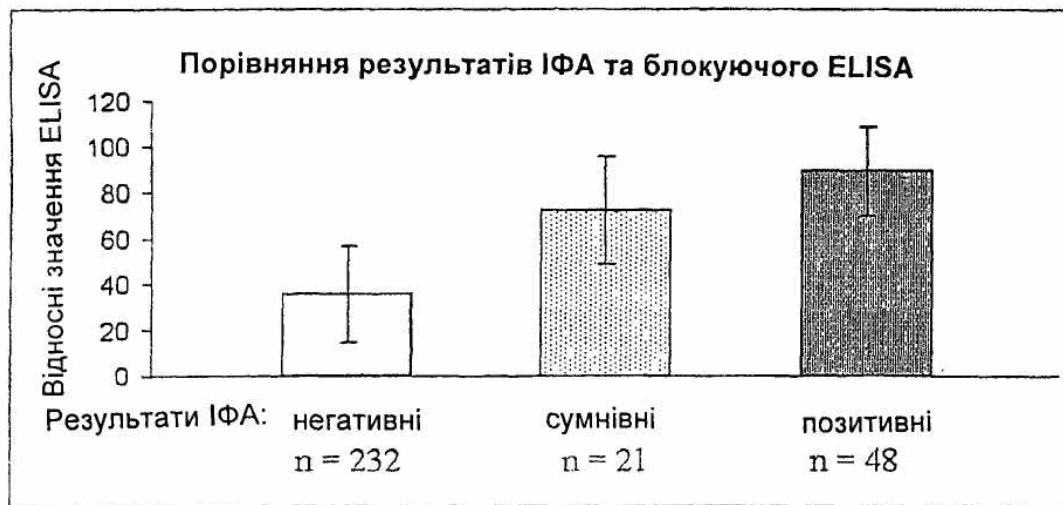
Новий ELISA, запропонований у даному винаході, являє собою ефективний спосіб діагнозу ілеїту, який можна застосовувати для стандартного аналізу зразків великого розміру й крос-секційних скринінгів черід.

### Посилання

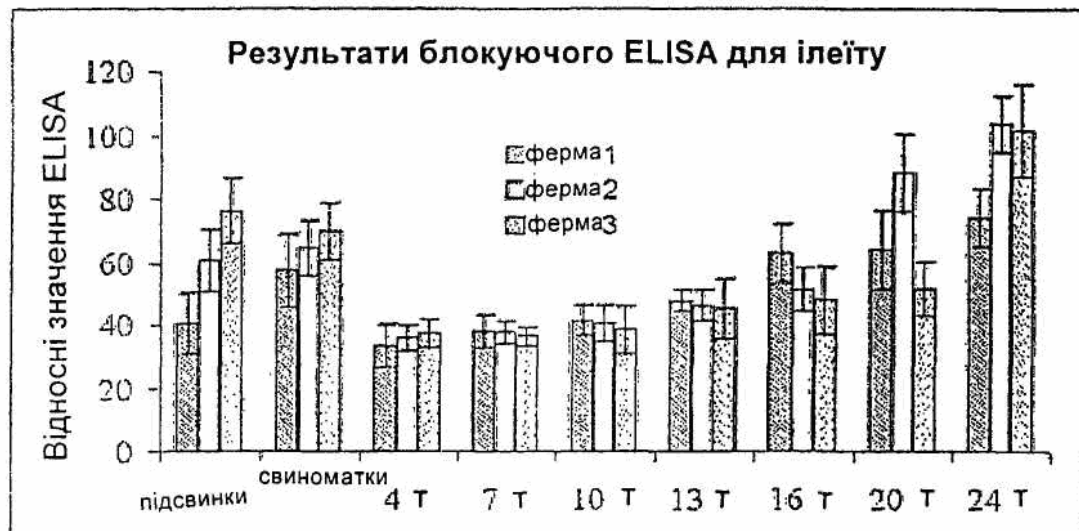
1. Knittel JP і ін., AJVR 59: 722-726
2. Guedes RCM і ін., Can. J. Vet. Res., 66, 2002, стор. 99-107
3. Jones GF., J. Clin. Microbiol., 31, 1993, стор. 2611-2615.
4. Suh-DK і ін., J. Vet. Sci., 1, 2000, стор. 33-37
5. McOrist S і ін., Vet Pathol., 26, 1989, стор. 260-264
6. Huerta B і ін., J. Comp. Path., 129, 2003, стор. 179-185
7. Biksi I і ін., Proc. 17<sup>th</sup> IPVS, 2002, Ames, Iowa, USA
8. van Aken N. і ін., 17<sup>th</sup> IPVS, 2002, Ames, Iowa, USA
9. Holyoake PK і ін., J. Clin. Microbiol, 32, 1994, стор. 1980-1985.



Фіг. 1



Фіг. 2



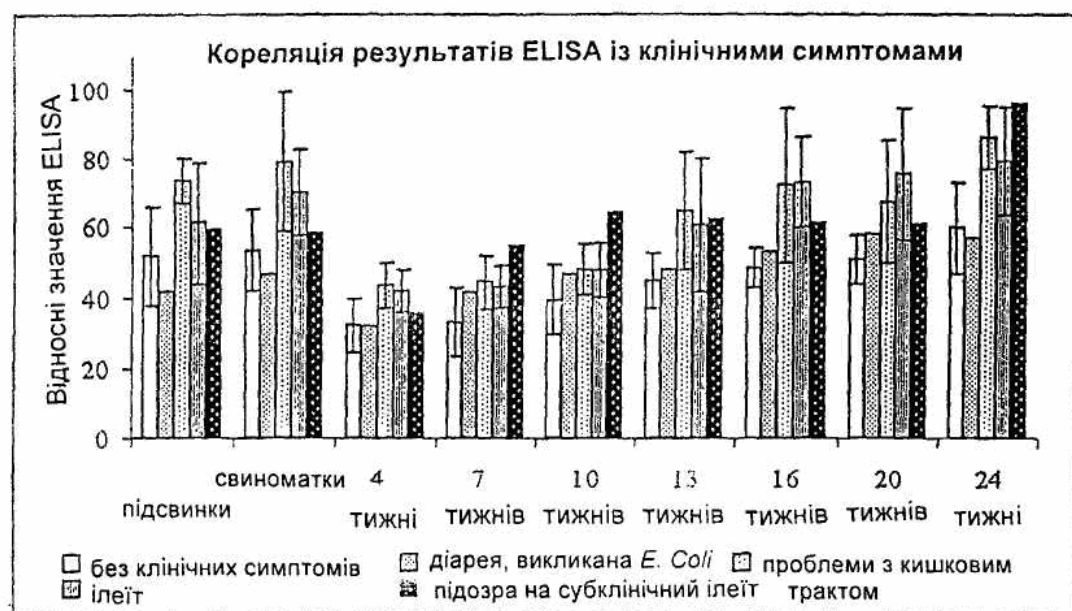
Результати ІФА-тесту	ферма 1	ферма 2	ферма 3
підсвинки	0 / 0 / 9	3 / 1 / 6	0 / 6 / 4
свиноматки	1 / 3 / 6	0 / 0 / 10	0 / 1 / 9
4 т	0 / 2 / 8	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
7 т	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
10 т	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
13 т	0 / 0 / 8	0 / 0 / 10	2 / 3 / 5
16 т	1 / 0 / 9	0 / 1 / 9	0 / 0 / 10
20 т	0 / 4 / 4	5 / 3 / 2	0 / 1 / 9
24 т	0 / 3 / 7	9 / 0 / 1	7 / 3 / 0

Фіг.3





Фіг.4



Фіг.5