

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580032313.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/544 (2006.01)  
C12P 19/04 (2006.01)  
C07G 17/00 (2006.01)  
A61K 39/02 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月31日

[11] 公开号 CN 101065666A

[22] 申请日 2005.8.10

[21] 申请号 200580032313.4

[30] 优先权

[32] 2004.8.13 [33] US [31] 10/918,006

[86] 国际申请 PCT/US2005/028464 2005.8.10

[87] 国际公布 WO2006/020730 英 2006.2.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.3.26

[71] 申请人 勃林格殷格翰动物保健有限公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 J·J·克罗尔 M·B·鲁夫

M·A·艾希梅厄

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 韦东

权利要求书3页 说明书13页

[54] 发明名称

回肠炎诊断测定

[57] 摘要

本发明提供了保护抗细胞内劳森氏菌抗体的改进的免疫测定法，该方法能够快速、方便地检测动物衍生标本中低浓度的抗劳森氏菌抗体。优选的测定法是采用细胞内劳森氏菌脂多糖的抗原性提取物的ELISA测定。

1. 一种检测动物衍生标本中抗细胞内劳森氏菌(*Lawsonia intracellularis*)抗体的存在的免疫测定法, 所述方法包括以下步骤: 使所述标本接触有效量的含有至少一部分细胞内劳森氏菌脂多糖的抗原, 以使所述抗原和所述抗体之间形成复合物, 以及检测所述复合物的存在。
2. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述标本选自动物衍生的血清、初乳、关节液、唾液、组织匀浆或粪便。
3. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述动物选自猪、仓鼠、蓝狐、鹧鸪、鹿、犬、豚鼠、马、猕猴、鸵鸟、兔或大鼠。
4. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述抗体选自 IgG、IgA 或 IgM 抗体。
5. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述免疫测定是 ELISA 测试。
6. 如权利要求 5 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述抗原是重组产生的。
7. 如权利要求 5 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述 ELISA 测试包括以下步骤: 将所述抗原固定在表面上, 使所述标本接触所述固定的抗原, 以使所述标本中的抗体和所述抗原之间形成复合物, 以及检测所述复合物。
8. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述脂多糖的分子量约为 15-25 kDa。
9. 如权利要求 8 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述分子量约为 18-20 kDa。
10. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 给予动物有效量的抗原之后所述抗原能够在所述动物内诱导免疫应答。
11. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 采用细菌内毒素测试时, 所述抗原显示出约 3-75 EU/ml 的内毒性。
12. 如权利要求 11 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述内毒性约为 25-40 EU/ml。
13. 如权利要求 1 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述抗原含有 ATCC 登录号 PTA-4927 的脂多糖提取物。
14. 一种检测抗细胞内劳森氏菌(*Lawsonia intracellularis*)抗体的存在的抗原, 所述抗原含有至少一部分分离的细胞内劳森氏菌脂多糖。

15. 如权利要求 14 所述的抗原，其特征在于，所述脂多糖的分子量约为 15-25 kDa。
16. 如权利要求 15 所述的抗原，其特征在于，所述分子量约为 18-20 kDa。
17. 如权利要求 15 所述的抗原，其特征在于，给予动物有效量的抗原之后所述抗原能够在所述动物内诱导免疫应答。
18. 如权利要求 15 所述的抗原，其特征在于，采用细菌内毒素测试时，所述抗原显示出约 3-75 EU/ml 的内毒性。
19. 如权利要求 15 所述的抗原，其特征在于，所述脂多糖是重组产生的。
20. 如权利要求 18 所述的抗原，其特征在于，所述内毒性约为 25-40 EU/ml。
21. 如权利要求 14 所述的抗原，其特征在于，所述抗原含有 ATCC 登录号 PTA-4927 的脂多糖提取物。
22. 一种检测动物衍生标本中抗细胞内劳森氏菌(*Lawsonia intracellularis*)抗体的存在的酶联免疫测定法，其改进之处包括在所述免疫测定中使用细胞内劳森氏菌的脂多糖作为抗原。
23. 如权利要求 22 所述的免疫测定法，其特征在于，所述标本选自动物衍生的血清、初乳、关节液、唾液、组织匀浆或粪便。
24. 如权利要求 22 所述的免疫测定法，其特征在于，所述动物选自猪、仓鼠、蓝狐、鸚鵡、鹿、犬、豚鼠、马、猕猴、鸵鸟、兔或大鼠。
25. 如权利要求 22 所述的免疫测定法，其特征在于，所述抗体选自 IgG、IgA 或 IgM 抗体。
26. 如权利要求 22 所述的免疫测定法，其特征在于，所述 ELISA 测试是间接 ELISA 测试。
27. 如权利要求 26 所述的免疫测定法，其特征在于，所述 ELISA 测试包括以下步骤：将所述抗原固定在表面上，使所述标本接触所述固定的抗原，以使所述标本中的抗体和所述抗原之间形成复合物，以及检测所述复合物。
28. 如权利要求 22 所述的免疫测定法，其特征在于，所述脂多糖的分子量约为 15-25 kDa。
29. 如权利要求 28 所述的免疫测定法，其特征在于，所述分子量约为 18-20 kDa。
30. 如权利要求 22 所述的免疫测定法，其特征在于，给予动物有效量的抗原之后所述抗原能够在所述动物内诱导免疫应答。

---

31. 如权利要求 22 所述的免疫测定法, 其特征在于, 采用细菌内毒素测试时, 所述抗原显示出约 3-75 EU/ml 的内毒性。

32. 如权利要求 31 所述的免疫测定法, 所述内毒性约为 25-40 EU/ml。

33. 如权利要求 22 所述的免疫测定法, 其特征在于, 所述抗原含有 ATCC 登录号 PTA-4927 的脂多糖提取物。

## 回肠炎诊断测定

### 发明背景

#### 发明领域

本发明主要涉及用来检测抗细胞内劳森氏菌(*Lawsonia intracellularis*)抗体的改进的免疫测定法, 以及含有细胞内劳森氏菌(*L. intracellularis*)脂多糖的抗原性提取物并且优选基本上由其组成的有效抗原。优选的测定法是具有极好特异性和灵敏度的间接型 ELISA 测定, 采用这种测定法能够在疾病的临床征兆出现之前在感染的最初阶段检测动物衍生标本中低水平的抗体。

#### 现有技术描述

猪增生性肠炎(PPE), 也称为回肠炎、肠腺瘤病、出血性肠病或坏死性肠炎, 是一种自然产生的疾病, 它能够影响幼年(waning)到青壮年的猪。以前认为 PPE 是由 *campylobacter* 样生物或回肠共生胞内菌(*ileal symbiont intracellularis*)造成的。最近确定其病原体是细胞内劳森氏菌, 这是一种专性胞内革兰阴性菌。这种疾病会造成受感染动物的死亡损失、医疗费用增加、增重情况差以及食物转化率降低, 因此具有经济重要性。

合理治疗和有效控制 PPE 的一个关键因素是快速准确地鉴定病原体。可通过观察肉眼损伤(gross lesion)来诊断 PPE 并可通过观察到特定组织病理学(histopathological)损伤加以证实, 其中可通过包括使用抗劳森氏菌(*anti-Lawsonia*)单克隆抗体的专门染色方法来证实胞内弯曲杆菌。理想的是, 通过分离病原体作出最终的判定。然而, 分离和培养细胞内劳森氏菌要求专门的细胞培养技术。

过去已经尝试过开发检测抗劳森氏菌抗体的快速测定法。目前的基于血清学的测定法如间接荧光抗体测试(IFAT)和免疫过氧化物酶测定(IPMA)证实, 检测死前猪血清中的抗劳森氏菌抗体有良好的灵敏度和特异性。Knittel JP, Jordan DM, Schwartz KJ 等, 《对用于死前检测接触细胞内劳森氏菌的猪的聚合酶链反应和血清学方法的评价》(*Evaluation of Antemortem Polymerase Chain Reaction and Serological Methods for Detection of Lawsonia intracellularis-exposed Pigs*). American Journal of Veterinarian

Research. 59:722-726 (1998)。Guedes RMC, Gebhart CJ, Deen J 等, 《证实免疫过氧化物酶单层测定可作为猪增生性肠病的血清学测试》 (*Validation of an Immunoperoxidase Monolayer Assay as a Serological Test for Porcine Proliferative Enteropathy*). *Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation*. 14:528-530 (2002), 这些参考资料的教义和内容通过引用纳入本文。然而, 这些测定法对于检测通常在最初接触和感染开始期间在猪血清中发现的较低浓度的抗劳森氏菌抗体都不够灵敏。此外, 这些现有测定法依靠非常熟练的技术人员以准确进行测试和解释结果, 例如, 结果是花数小时观察显微镜、分析用 UV 或自然光照亮的孔、搜索被代表“阳性”样品的绿色荧光或红色荧光染色的细胞内劳森氏菌或细胞内劳森氏菌感染的细胞而主观获得的。

也已经开发了用于检测抗劳森氏菌抗体的酶联免疫测定法(ELISA)。这些之前的努力由于各种限制而无法进行足够灵敏和特异的测定, 所述限制包括抗原质量差和数量少、抗体效价的可变性、感染和非感染猪之间抗体效价的重叠、缺乏有效的阳性/阴性“截止(cut-off)”值以及猪抗体和非特异性抗原组分之间的交叉反应。Holyoake PK, Cutler RS, Caple IW, Monckton RP. 《用于检测猪血清中回肠共生胞内菌特异性免疫球蛋白 G 应答的酶联免疫吸附测定法》 (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Measuring Ileal Symbiont intracellularis-specific Immunoglobulin G Response in Sera in Pigs*). *Journal of Clinical Microbiology*. 31:1980-1985 (1994), 其教义和内容通过引用纳入本文。

因此, 本领域需要一种高度灵敏和特异的改进的抗劳森氏菌抗体测定法, 该方法能够在感染早期阶段准确检测动物衍生标本中低浓度的抗体。

脂多糖(LPS)是革兰阴性菌如细胞内劳森氏菌的主要超结构(suprastructure), 它极大促成了细菌的结构完整性和保护细菌不受宿主免疫防御攻击。LPS 形成了革兰阴性菌细胞壁的一部分并包含三个部分: 多糖侧链、核心多糖和脂质 A。脂质 A 可能含有罕见的脂肪酸(例如, 羟基肉豆蔻酸(hydroxy-myristic acid)), 而核心多糖通常含有罕见的糖(例如, KDO、酮脱氧辛酮酸(keto-deoxy octulonate)和庚酮糖)。多糖侧链被称为细菌的 O-抗原。LPS 起内毒素的作用, 这是由于它们能结合巨噬细胞的 CD 14 受体、引发巨噬细胞/内皮细胞分泌促炎细胞因子的完整级联反应。

## 发明概述

本发明克服了上述问题并提供了一种改进的检测抗细胞内劳森氏菌抗体的存在的免疫测定法，该方法具有高特异性和灵敏度，能够用于 PPE 的早期检测。一般来说，本发明的测定法是一种免疫测定法，其中，使动物衍生的标本接触有效量的含有至少一部分细胞内劳森氏菌脂多糖的抗原以使所述抗原和所述抗体之间形成复合物，然后检测这种抗原-抗体复合物的存在。在优选形式中，所述测定法是间接 ELISA 测试。

所述动物衍生的标本最优选是血清，但也可以包括初乳、关节液、唾液、组织匀浆和粪便。这些标本可按照用于测定目的的常规技术来制备。尽管本发明特别涉及检测猪的 PPE，但也可在诸如猪、仓鼠、蓝狐、鸸鹋(emus)、鹿、犬、豚鼠、马、猕猴、鸵鸟、兔和大鼠等动物中检测由劳森氏菌(*Lawsonia*)引起的类似疾病。用本发明的方法检测的抗体通常选自 IgG、IgA 或 IgM 抗体。

用于本发明的免疫测定法的优选抗原是细胞内劳森氏菌脂多糖的一部分或提取物。这种提取物的分子量优选约为 15-25 kDa，更优选约为 18-20 kDa。其提取物或部分应具有足够的大小和抗原性，以便在给予有效量抗原之后在动物中诱导免疫应答。此外，其提取物或部分必须有足够大小以与 LPS 抗体形成抗体-抗原复合物。在特别优选的形式中，采用细菌内毒素测试，所述 LPS 抗原显示出约 3-75 EU/ml(更优选约 10-60 EU/ml，再优选约 20-50EU/ml，再优选约 25-40 EU/ml)的内毒性(endotoxicity)。所述抗原优选主要由 LPS 提取物组成，用 ATCC 登录号 PTA-4927 的细胞内劳森氏菌提取物获得了良好结果。

本申请发现可使用各种类型的免疫测定法，其中包括但不限于：ELISA，如竞争性或抑制性测定法，并包括直接和间接测定法，以及夹心或捕获抗体测定法。最优选的免疫测定法是间接型 ELISA，它包括首先用 LPS 包被微量滴定板孔，然后室温孵育过夜。然后加入封闭剂并再在 4℃孵育过夜。然后加入选择的稀释检测抗体，在 37℃孵育 1 小时，然后加入稀释的偶联物(conjugate)再孵育 1 小时(37℃)。然后加入 TMB 发色剂并室温孵育 5 分钟。此时加入 2M 硫酸终止反应并在 450nm 阅读平板。

在 ATCC 登录号 PTA-4927 的起始 LPS 提取物样品的内毒素水平约为 34.75 EU/ml 的情况下，优选的 ELISA 测试最好。在该例子中，抗原的稀释度应为约 1:250 至 1:8000，更优选约 1:400 至 1:6000，再优选约 1:500 至 1:4000，再优选约 1:600 至 1:3000，再优选约 1:750 至 1:2000，再优选约 1:900 至 1:1500，最佳为 1:1,000。检测抗体的稀释水平应约为 1:20-1:320、1:25-1:240、1:30-1:128、1:35-1:60，最佳为 1:40。ELISA

偶联物的应用水平约为 1:250-1:2000、1:300-1:1500、1:350-1:1000、1:400-1:600，优选 1:500。当然，如果起始抗原具有不同于本发明优选产品的内毒素水平，可方便地计算合适的稀释水平。

本发明还可将重组 LPS 抗原用作抗原来源。此时，所述 LPS 抗原或其部分将采用常规的重组技术产生。例如，可将编码该 LPS 抗原或其所需部分的 DNA 插入表达载体并操作性连接于表达控制序列，然后该表达控制序列可使表达载体表达所需 LPS 抗原或其部分。然后回收表达的抗原并按照本发明使用。当然，精通本领域的技术人员熟悉产生和回收本发明的重组抗原的各种方法。在所有情况中，本发明的重组抗原将优选结合细胞内劳森氏菌抗体或与其杂交。

### 优选实施方案的描述

以下实施例列出了构建劳森氏菌 LPS 和将其用作免疫测定抗原来源的目前优选的技术。这种实施例包括针对劳森氏菌抗体的间接型 ELISA 免疫测定。然而还应理解，这种实施例仅以说明方式提供，不能理解为是要限制本发明的总范围。

## 实施例 I

### 基于 LPS 的间接 ELISA 测定的开发和证实

#### 细菌抗原的制备

细菌分离物被鉴定为多次传代的(从来自感染内脏的最初分离物传代 20 次以上)细胞内劳森氏菌分离物#15540(ATTC 登录号 PTA-4927)。这种分离物获自被急性出血性增生性肠病(HPE)感染的丹麦母猪(Danish sow)，感染可通过常规的组织学和免疫组织化学(IHC)染色技术证实，并用之前描述过的方法共培养以获得细胞内劳森氏菌的纯培养物。Lawson GHK, McOrist S, Jasni 等,《猪增生性肠病的胞内菌: 体外培养 and 维持》(*Intracellular Bacteria of Porcine Proliferative Enteropathy: Cultivation and Maintenance in Vitro*). *Journal of Clinical Microbiology*. 31:1136-1142 (1993), 其教义和内容通过引用纳入本文。在生物反应器(Applicon, Inc., Foster City, CA)中用新鲜的 McCoy 细胞(ATCC #1696)悬液繁殖多批每批 30 升的细胞内劳森氏菌#15540。使活性培养物达到 80-100%细胞侵染性，然后用装有 JA-10 转头的 Avanti Beckman J-20I 离心机(Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA)在 4°C 以 17,000 x g 离心 15 分钟收获。弃去各批次的上清液，将含有细胞外的细胞内劳森氏菌和被细胞内劳森氏菌感

染的 McCoy 细胞的细胞团重悬于 30 ml 无菌 1X 磷酸盐缓冲盐水(PBS), 并储存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

为从 McCoy 细胞纯化细胞内劳森氏菌, 按照之前描述过但略经修改的方法制备不连续的 percoll 梯度。Holyoake PK, Cutler RS, Caple IW, Monckton RP. 《用于检测猪血清中回肠共生胞内菌特异性免疫球蛋白 G 应答的酶联免疫吸附测定法》*Journal of Clinical Microbiology*. 31:1980-1985 (1994), 其教义和内容通过引用纳入本文。简言之, 将 225 ml percoll (Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech, 乌普萨拉, 瑞典)与 260 ml 试剂级(RG)水和 15 ml 5M 氯化钠(NaCl, Fisher 牌)混合。使上面提到的收获的培养物通过 25 号针 20 次以上, 并将 5 ml 细菌/McCoy 细胞匀浆转移到置于 30 ml 聚碳酸酯离心管内的 25 ml percoll 梯度中。将管翻转以混合并在  $4^{\circ}\text{C}$  以  $37,000 \times g$  离心 1 小时。离心管的上半部分为含有分散的细胞碎片的悬浮液, 而在浮力密度为  $1.075 \text{ g/ml}$  的地方出现了明显的细胞条带。除去梯度的上半部分, 用 5 ml 聚丙烯移液管小心收集条带并将条带转移到新的含有 20 ml 无菌 PBS 的 30 ml 离心管中。将离心管在  $4^{\circ}\text{C}$  以  $37,000 \times g$  离心(Avanti Beckman J-20I, JA-17 转头)15 分钟, 该过程最多重复 3 次以洗净各样品中的 percoll。最后一次离心步骤之后, 将团块重悬于 1-2 ml 无菌 PBS, 汇合, 等分到 1.8 ml 的冻存管(Nalgene, Nalgene Nunc Int'l., Rochester, NY)并储存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。在暗视野显微镜下观察含有高度浓缩的、percoll 纯化的细胞内劳森氏菌#15540 的重悬样品以证实存在微小的弯曲杆菌而不存在完整 McCoy 细胞。采用之前描述过但略经修改的方法用热的酚水溶液(aqueous phenol)提取 percoll 纯化的细胞内劳森氏菌#15540 抗原的 LPS 抗原性组分。Westphal, O.和 Luderitz, O. *Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gramnegativer Bakterien*. *Angew. Chemical* 66: 407-17 (1954), 其内容和教义通过引用纳入本文。简言之, 将 18 ml percoll 纯化的细胞内劳森氏菌和 3.75 ml 酚氯仿(Ameresco, Solon, OH), pH 8.0 在  $65^{\circ}\text{C}$  的水浴中分别孵育 10 分钟。最初的孵育期之后将 4.5 ml percoll 纯化的细胞内劳森氏菌转移到含有 4.5 ml 90%(v/v)热的酚氯仿水悬液(aqueous phenol suspension chloroform)的各个试管中并通过翻转轻轻混合。将试管在  $65^{\circ}\text{C}$  的水浴中再孵育 25 分钟, 在孵育期间每 5 分钟翻转混合一次, 然后在  $4^{\circ}\text{C}$  冷却过夜。冷藏储存期间在各管中水相和固相发生轻微分层。各管在  $4^{\circ}\text{C}$  以  $7,700 \times g$  离心(Avanti Beckman J-20I, JA-17 转子)25 分钟, 收集来自所有 4 个试管的含有 LPS 的上清液并保留, 弃去细胞团。将上清液转移到预先灭菌的透析管(Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Domingo, CA)中, 将

透析管放在 4L 的塑料烧杯中并用冷的试剂级(反渗透)水透析 24-48 小时以除去样品中的酚氯仿。每 2-4 小时用新鲜水更换新的试剂级水直到洗涤步骤完成。小心收集所得纯化的细胞内劳森氏菌 LPS 提取物并储存于-80℃待用。

在 MOPS 电泳缓冲液(NuPAGE, Invitrogen)中通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)用 4-12%的 Bis-Tris 预制凝胶(NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA)分离以通过目测确认 LPS 提取物。将 LPS 提取物与 percoll 纯化的全细胞细胞内劳森氏菌和未感染的全细胞 McCoy 细胞进行比较。按 1:2 稀释入 4X 十二烷基硫酸锂(LDS)变性缓冲液(NuPAGE, Invitrogen)并在 85℃的水浴中孵育 10 分钟以制备 SDS-PAGE 样品。按照 Bio-Rad Silver Stain 的说明书(略经修改)用高碘酸银染色凝胶。简言之,首先用 40%甲醇(MeOH, Fisher 牌, Hanover Park, IL)/10%乙酸(Fisher 牌)(v/v)第一次固定凝胶 20-30 分钟,然后在含有 0.7%高碘酸的 40% MeOH/10%乙酸(v/v)中室温再孵育 5 分钟。第二次固定时将凝胶转移到 10%乙醇(EtOH)/5%乙酸(v/v)中 5 分钟,然后用氧化剂(Bio-Rad, Hercules, CA)氧化 5 分钟,之后用去离子水洗涤直到凝胶的黄色消失。在 0.16mM 的二硫苏糖醇(DTT)水溶液中孵育凝胶 5 分钟然后用银试剂(Bio-Rad)室温染色 20 分钟。凝胶用去离子水洗涤一次(20-40 秒)并放在显影剂(Bio-Rad)中直到出现所需强度的条带。在 5%(v/v)乙酸中室温放置 20 分钟以终止反应,并用去离子水洗涤一次。用 10-220 kDa 的蛋白质标准(BenchMark, Invitrogen)以分子量鉴定蛋白质。

### 基于 LPS 的间接 ELISA

用基于细胞内劳森氏菌 LPS 的间接酶联免疫吸附测定(LPS-ELISA)检测测试样品中的抗劳森氏菌免疫球蛋白 G(IgG)抗体。用以 1:1000 稀释入 0.05M 碳酸钠包被缓冲液(pH 9.6)的细胞内劳森氏菌 LPS 以 100 μl/孔包被 Immulon 2HB 板(Dynex, Chantilly, VA),用聚酯薄膜平板密封器(Thermo LabSystems, Franklin, MA)密封并于室温孵育 24 小时。各板用 Ultrawash PLUS(Dynex)洗涤, 350 ml/孔, 无需浸泡, 用含有 0.05% Tween 20 (Fisher 牌)、0.137M NaCl (Fisher 牌)、0.005M 氯化钾(KCl, Sigma, St. Louis, MO)、0.009M 磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Sigma)、0.001M 磷酸钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Sigma), pH 7.2-7.4 的洗涤缓冲液的 RG 水溶液洗涤 1 轮。用在 SeaBlock™ (Pierce Biotech, Rockford, IL, 含有虹鳟鲑鱼(steelhead salmon)血清和 0.1%氧化钠的 PBS 溶液)中含有 5%(v/v)脱脂奶粉(Bio-Rad)的封闭缓冲液以 300 ml/孔在 4℃封闭抗原包被的平板 24 小时以防止测试血清非特异性结合于平板。然后如上所述洗涤各板 3 次。用封闭缓

冲液以 1:40 预先稀释测试血清和对照。

将稀释的血清以每孔 50 微升一式两份转移到各平板,密封并在 37°C 孵育 1 小时。将洗涤步骤重复 3 轮,然后以 50  $\mu$ l/孔加入用封闭缓冲液 1:500 稀释的羊抗猪 IgG 辣根过氧化物酶(HRP)偶联物(Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)。密封平板并在 37°C 孵育 1 小时。洗涤步骤重复 3 轮以上,然后在各板加入 50  $\mu$ l/孔由双组分(2-component)3,3',5,5'四甲基联苯胺(TMB, KPL)构成的过氧化物酶底物并于室温孵育 5 分钟。这样做是为了观察各测试样品内抗原-抗体复合物的存在。每孔加入 50  $\mu$ l 2M 硫酸( $H_2SO_4$ , Fisher 牌)溶液终止生色反应。在 V-max 96 孔微板阅读器(Medtechs, Inc., Chapel Hill, NC)上以 450nm 波长阅读平板以获得各测试样品的光密度(OD)值。各平板包括含有针对细胞内劳森氏菌 LPS 提取物的高阳性到低阳性抗体(用封闭缓冲液连续 2 倍稀释高阳性样品得到)以及阴性抗体的标准对照。如果在对标准 OD 值的线性回归分析中决定系数( $r^2$ -值)为<sup>3</sup> 0.9,则认为该测试平板有效。不含测试样品或对照样品的空孔被作为所有测试的空白对照。

#### LPS-ELISA 的验证

从以下研究获得猪血清以便用于验证用来检测猪中抗劳森氏菌 IgG 抗体的 LPS-ELISA。(i) 通过肌肉内注射用 1:2 的细胞内劳森氏菌 LPS 提取物和弗氏不完全佐剂(Sigma)配制的 2ml 制剂,使两只约 3 周龄的猪超免。对一只约 3 周龄的猪肌肉注射用 1:2 的 Dulbecco 极限必需培养基(DMEM)和 5%(v/v)牛血清(JRH Biosciences, Lenexa, KS)组成的安慰剂与弗氏不完全佐剂配制的 2ml 制剂。初免后,在第 3 周和第 6 周用各接种物加强免疫以产生阳性(有细胞内劳森氏菌 LPS 的抗体)和阴性(无细胞内劳森氏菌抗体)对照测试血清。在接种前、接种后的第 3 周和第 6 周收集各猪的 4-6 毫升血清,通过间接荧光抗体血清学测试(IFAT)检测细胞内劳森氏菌全细胞抗原的反应,以证实血清样品中存在或不存在抗劳森氏菌抗体,可参见 Knittel JP, Jordan DM, Schwartz JK 等,《对用于死前检测接触细胞内劳森氏菌的猪的聚合酶链反应和血清学方法的评价》 American Journal of Veterinarian Research. 59: 722-726 (1998),其教义和内容通过引用纳入本文。初次接种 8 周后,对动物实施安乐死并收集最终的血清。收集各猪的阳性对照血清,通过 IFAT 检测以证实对细胞内劳森氏菌的阳性反应,抗劳森氏菌 LPS 的阳性和阴性对照血清都以 1ml 等分储存于-80°C。

对来自之前进行的 2 次疫苗功效研究的猪血清进行测试以研究抗劳森氏菌 LPS 抗体阳性/阴性光密度截止限,参见 Kroll, J.等, (2004).《口服细胞内劳森氏菌无毒

活疫苗之后评价猪的保护性免疫》(Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *L. intracellularis*). AJVR 65(5): 559-565, 其教义和内容通过应用纳入本文。用毒性异源性细胞内劳森氏菌分离物 N101494(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, MO)实验性感染之后,产生了之前被证实为抗劳森氏菌抗体 IFAT-阳性的 80 只 6-9 周龄的猪的测试血清。从 80 只 3-9 周龄在各临床研究期间的任何时刻都未接受疫苗接种或刺激的旧标准(old strict)对照猪收集到之前被证实为 IFAT-阴性的测试血清。

接种细胞内劳森氏菌减毒活疫苗 Enterisol<sup>®</sup> Ileitis(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.)之后、用毒性异源性细胞内劳森氏菌分离物 N101494 刺激之后、或者进行这两者之后收集 25 只猪的 175 份血清样品。从在整个研究中未接受疫苗接种或刺激且保持抗劳森氏菌抗体的 IFAT 阴性的 10 只标准对照猪收集另外 70 份血清样品。研究设计包括 35 只 3-4 周龄的猪,将它们随机分成 3 个治疗组。在研究的第 0 天,组 1 的 15 只接受 2 ml 口服剂量的疫苗,而组 2 和 3(10 只猪/组)接受等剂量的安慰剂,安慰剂由悬浮在生长培养基中的未感染 McCoy 细胞组成。在第 21 天,胃内给予组 1 和 2 的猪细胞内劳森氏菌 N101494 的毒性异源性纯培养物进行刺激。在第 42 天,对猪进行尸体解剖并评价损伤发展以鉴定接种疫苗的猪相比未接种疫苗的猪在刺激后的表现。从第 0-42 天每周收集粪便样品和血清供常规诊断测试,以便检测由于施用疫苗或刺激而造成的细胞内劳森氏菌的接触率(rate of exposure)和主动排泄率(active shedding)。在第 42 天只通过下述肉眼检查、组织学和 IHC 法评价损伤以证实存在 PE。

#### 证实猪的 PE

按照粘膜厚度标准(1 = 正常, 2 = 轻微增厚, 3 = 中度增厚/炎症, 4 = 严重增厚/炎症/可能存在粘膜出血或坏死)对上述临床研究中的猪回肠和结肠中发现的肉眼损伤进行评分。Kroll, J.等, (2004). 《口服细胞内劳森氏菌无毒活疫苗之后评价猪的保护性免疫》(Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*). AJVR 65(5): 559-565。死后(post mortem)收集长度为 2-4 cm 的回肠和结肠样品,浸入福尔马林缓冲液固定并对其进行加工以便检测显微损伤。其中包括苏木精和曙红(H&E)以及细胞内劳森氏菌特异性单克隆抗体的 IHC 染色。Kroll, J 等, AJVR, (2004)。后者被认为是猪实际感染细胞内劳森氏菌的状态的目前评价标准。Kroll, J.等, (2004)。按照细胞内劳森氏菌特异

性细胞增殖的严重性(0 = 正常, 1 = 轻微/病灶, 2 = 中度/扩散, 3 = 严重/扩散)对 IHC 染色组织中发现的显微损伤分别评分。计算肉眼和显微损伤的平均评分以及受影响组织中检测到的损伤发生频率, 以进行组间比较。在之前的研究中, 肉眼和显微损伤的平均评分被认为是判断疫苗对抗毒性异源性刺激的功效的主要参数。Kroll, J. 等, (2004)。

## 实施例 II

### 优选的 LPS-ELISA 材料和方法

下面列出了根据本发明目前优选的 LPS-ELISA 测定法。

#### A. 方案

##### 1. 材料

##### a. LPS 结合平板:

- Immunlon 2 HB 96 孔板, Dynex 目录号 3455 或等价物。

##### b. 稀释平板:

- Falcon Pro-Bind 试验平板(Fisher Scientific, Pittsburg, PA), 96 孔, U 形底, 无盖(聚苯乙烯, 非无菌), Becton Dickinson (San Diego, CA) 目录号 353910 或等价物。

##### c. 平板密封器:

- Mylar 平板密封器, Thermo Labsystems (Franklin, MA) 目录号 5701 或等价物。

##### d. 包被缓冲液:

- 0.05M 碳酸钠缓冲液
  - 10.6 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  Sigma 目录号 S6139 或等价物。
  - 用试剂级(RG)  $\text{H}_2\text{O}$  (或等价物)补足至 1.0 L。
  - $\text{pH} = 9.6 \pm 0.1$ 。
  - 储存于  $2-7^\circ\text{C}$  待用。
  - 失效: 7 天。

##### e. 洗涤液:

- 0.05% Tween 20、0.137M NaCl、0.005M KCl、0.009M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.001M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- 32.0 g NaCl。
- 0.8 g KCl。
- 2.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>。
- 0.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。
- 用 RG H<sub>2</sub>O 或等价物补足至 4.0 L。
- 用 NaOH 或 HCl 将 pH 调至 7.2-7.4。
- 2.0 ml Tween, Fisher 目录号 BP337-100 或等价物。
- 储存于室温(25±5℃)待用。
- 失效: 1 周。

f. 封闭液:

- 含有 5%脱脂奶粉的 Seablock™。
- 25.0 g 脱脂奶粉。Bio-Rad 目录号 170-6404 或等价物。
- 用 Seablock™(Pierce Biotech 目录号 37527 或等价物)补足至 500 mL。
- 储存于 2-7℃待用。
- 失效: 1 个月。

g. 抗原:

- 细胞内劳森氏菌脂多糖完整分子的 1:1000 稀释液。
- 在 40 ml 包被缓冲液中加入 40 μl 细胞内劳森氏菌 LPS。
- 立即使用。

h. 检测抗体:

- 康复期猪的细胞内劳森氏菌血清抗体的 1:40 稀释液。
- 在 120 μl 封闭液中加入 3 μl 猪血清或等价物。
- 储存于 2-7℃待用。
- 失效: 24 小时。

i. 偶联抗体:

- 山羊抗小鼠 IgG (H+L)-辣根过氧化物酶(HRP)的 1:500 稀释液。Kierkegaard and Perry Laboratories, Inc.目录号 14-14-06 或其等价物。
- 在 20 ml 封闭液中加入 40 μl 偶联物。
- 储存于 2-7℃待用。
- 失效: 24 小时。

j. 底物:

- 双组分微孔过氧化物酶底物(Gaithersburg, MD), KPL 目录号 50-76-00 或等价物。
- 临用前将 TMB 过氧化物酶底物(试剂 A)与过氧化物酶溶液 B(试剂 B) 等体积混合。
- 所需体积 = 5 mL/板。因此, 每块测试平板需要 2.5 mL 试剂 A + 2.5 mL 试剂 B。
- 储存于 2-7°C 待用。
- 失效: 预混合的试剂遵照制造商建议的有效期。立即使用混合的底物溶液。

k. 终止液:

- 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。
  - 在通风橱中小心混合: 444.4 ml RG H<sub>2</sub>O。
  - 55.6 ml 18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Fisher 目录号 A300c-212, 或等价物。
  - 储存于室温待用。
  - 失效: 6 个月。

l. 阳性对照

- 含抗-劳森氏菌 LPS IgG 抗体的超免猪血清的 1:2564 稀释液。
  - 在 10 ml 封闭液中加入 3.9 μl 阳性对照(批号#090203)。
  - 储存于 2-7°C 待用。
  - 失效: 24 小时。

m. 阴性对照

- 不含抗细胞内劳森氏菌 LPS 分子抗体的超免猪血清的 1:2564 稀释液。
  - 在 10 ml 封闭液中加入 3.9 μl 阳性对照(批号#090203)。
  - 储存于 2-7°C 待用。
  - 失效: 24 小时。

2. 方法

- a. 样品一式两份进行实验。所需平板数 = 样品总数/每板 40 个样品。向上取整到整数。第 11 和 12 列将含有 1:10 连续稀释的阴性和阳性对照血清。
- b. 将细胞内劳森氏菌 LPS 抗原以 1:1000 或适当工作稀释度稀释入包被缓冲液中。

所需体积 = 平板数 × 10 ml/板。

c. 在各板的每个孔中加入 100 ml 稀释的抗原。

d. 用平板密封器密封平板并在室温孵育过夜(14-24 小时)。

e. 用 Dynex Ultrawash PLUS 洗涤液洗涤平板, 350 ml/孔, 无需浸泡, 洗涤 1 轮。  
在纸巾上拍干平板。

f. 在所有孔中加入 300 ml 封闭液。密封平板并在 2-7°C 孵育过夜(14-24 小时)。

g. 用 Dynex Ultrawash PLUS 洗涤液洗涤平板, 350 μl/孔, 无需浸泡, 洗涤 3 轮。  
在纸巾上拍干平板。

h. 在 U 形底稀释平板第 1-10 列的所有孔和第 11 和 12 列的孔 B-H 中加入 120 μl 封闭液样品。

i. 在第 11 和 12 列 A 排的孔中分别加入 240 μl 阴性和阳性对照。

j. 用 50-300 μl 的多通道移液器将孔 A-11 和 A-12 中的 120 μl 稀释对照转移到孔 B-11 和 B-12 中以产生各对照血清的 10 倍稀释液, 注意不要将稀释的阴性对照转移到第 11 列最后一个孔中(孔 H-11), 该孔中的样品将作为平板空白孔。

k. 将 3 μl 样品转移到稀释平板各孔内的 120 μl 封闭液中以便将检测抗体(康复期猪血清)1:10 稀释入封闭液。每次在孔 A-1、B-1、C-1 等中加入不同样品进行稀释。

l. 用 50-300 μl 的多通道移液器上下吹打至少 3 次以混合第 1 列的内容物, 并将 50 μl/孔转移到抗原包被的 LPS 结合测试平板的第 1 和 2 列。更换吸头并重复该步骤直到所有稀释的样品都已一式两份转移到该平板中。

m. 将 50 μl/孔阴性对照(第 11 列的孔 A-H)转移到测试平板相应的孔中。对阳性对照重复该步骤。各对照含有足以用于 2 块测试平板的稀释样品。

n. 用平板密封器密封测试平板并在 37°C ± 2.0°C 孵育 1.0 小时 ± 15 分钟。

o. 用 Dynex Ultrawash PLUS 洗涤液洗涤平板, 350 μl/孔, 无需浸泡, 洗涤 3 轮。  
在纸巾上拍干平板。

p. 在测试平板的所有孔中加入 50 μl 以 1:500 或适当工作稀释度稀释的偶联抗体。  
所需体积 = 平板数 × 5 ml/板。

q. 用平板密封器密封测试平板并在 37°C ± 2.0°C 孵育 1.0 小时 ± 15 分钟。

r. 用 Dynex Ultrawash PLUS 洗涤液洗涤平板, 350 μl/孔, 无需浸泡, 洗涤 3 轮。  
在纸巾上拍干平板。

s. 在测试平板的所有孔中加入 50 μl 底物, 并室温孵育 5 分钟 ± 1 分钟。

t. 加入底物 5 分钟后在所有孔中加入 50  $\mu$ l 终止液以终止反应。

u. 在装备有 450 nm 波长滤镜的平板阅读器上读板。

### 3. 结果解释

a. 在 450nm 处光密度 $>0.200$  的测试样品被认为是抗-劳森氏菌 LPS IgG 抗体阳性。

b. 在 450nm 处光密度 $<0.200$  的测试样品被认为是抗-劳森氏菌 LPS IgG 抗体阴性。

专利名称(译)	回肠炎诊断测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN101065666A</a>	公开(公告)日	2007-10-31
申请号	CN200580032313.4	申请日	2005-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰动物保健有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰动物保健有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰动物保健有限公司		
[标]发明人	JJ克罗尔 MB鲁夫 MA艾希梅厄		
发明人	J·J·克罗尔 M·B·鲁夫 M·A·艾希梅厄		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/544 C12P19/04 C07G17/00 A61K39/02 C07G99/00		
CPC分类号	G01N2469/20 G01N33/56911		
代理人(译)	韦东		
优先权	10/918006 2004-08-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了保护抗细胞内劳森氏菌抗体的改进的免疫测定法，该方法能够快速、方便地检测动物衍生标本中低浓度的抗劳森氏菌抗体。优选的测定法是采用细胞内劳森氏菌脂多糖的抗原性提取物的ELISA测定。