

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246286 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438650**

(22) Data zgłoszenia: **2021.07.30**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.06 BUP 06/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.12.30 WUP 53/2024**

(51) MKP:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**BIOVETIKA SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

TOMASZ LIPIŃSKI, Wrocław, PL

JAKUB SIEDNIENKO, Dobroszyce, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Dorota Rzążewska, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania kompleksów białek z lipopolisacharydami bakteryjnymi,
ich zastosowanie, szczepionka zawierająca immunogeny kompleks LPS/białko
i sposób wytwarzania szczepionki**

PL 246286 B1

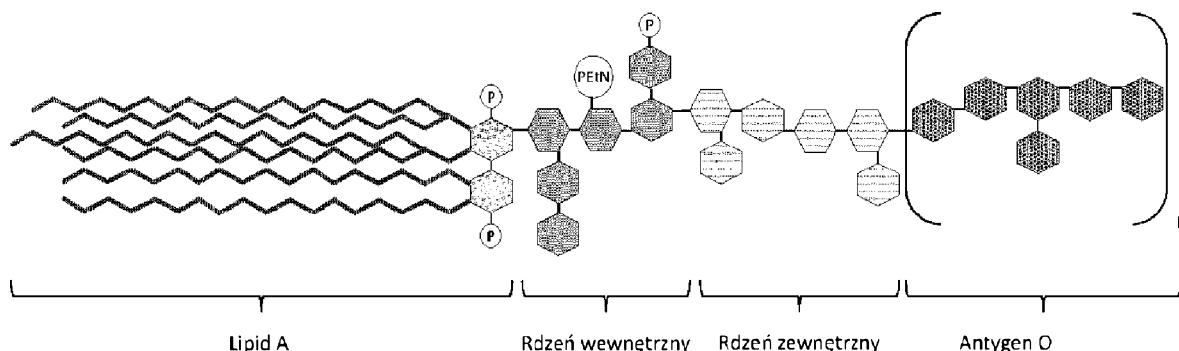
Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania kompleksów lipopolisacharydów bakteryjnych (LPS) z białkami o właściwościach immunogennych i ich zastosowania do formulacji szczepionek przeciwbakteryjnych. Kompleksy LPS z białkiem nośnikowym stosowane są jako immunogeny tj. cząsteczki zdolne do indukcji odpowiedzi immunologicznej w organizmach kręgowców w celu wytworzenia odpowiedzi immunologicznej mającej na celu ochronę przed patogenami bądź w celu uzyskania przeciwciał specyficznych do użytego immunogenu. Konjugaty białek z LPS lub uzyskanymi z niego fragmentami cukrowymi stosowane są w szczepionkach przeciwbakteryjnych oraz do uzyskiwania surowic zawierających przeciwciała specyficzne wobec antygenów cukrowych oraz uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych specyficznych do tych antygenów. Wynalazek dotyczy również szczepionki zawierającej immunogeny kompleks oraz sposobu wytwarzania szczepionki.

Zakażenia bakteriami gram-ujemnymi stanowią znaczny odsetek infekcji bakteryjnych i zakażeń szpitalnych. Śmiertelność jest znaczna pomimo stosowania antybiotyków. Problem pogłębia się wraz ze wzrostem ilości szczepów wielolekoopornych, które są odpowiedzialne za szczególnie ciężkie przypadki bakteriemii, często kończące się sepsą i zgonem pacjenta. Terapia sepsy jest jednym z istotnych zagadnień medycznych, które wciąż jest dalekie od rozwiązania. Obecnie stosuje się i bada szereg strategii terapeutycznych, najważniejsze to: usuwanie endotoksyn bakteryjnych z krwioobiegu, terapie podtrzymujące funkcje życiowe kluczowych organów, hamowanie nadmiernej aktywacji układu immunologicznego, neutralizacja endotoksyn przeciwciałami. Innym podejściem jest wytworzenie odporności na patogeny i endotoksyny za pomocą odpowiednich szczepionek. Celem dla szczepionek tradycyjnie są antygeny białkowe, jednak ze względu na fakt, iż głównym składnikiem zewnętrznej błony ściany komórkowej bakterii gram-ujemnych jest lipopolisacharyd bakteryjny, podjęto szereg badań zmierzających do wykorzystania LPS jako celu dla szczepionek.

Lipopolisacharydy to grupa makrocząsteczek zbudowanych z komponentu lipidowego zwanego zwykle lipidem A oraz części cukrowej o zróżnicowanej budowie i strukturze. W skład LPS wchodzi też niskocząsteczkowe podstawniki wpływające na właściwości biologiczne i fizykochemiczne LPS. Są to np. grupy fosforanowe, difosforany, fosfoetanolamina, metylo-fosforoamidowe, aminokwasy, glicerol i jego pochodne i inne. LPS zawierające część cukrową zbudowaną z niewielkiej liczby reszt cukrowych określa się często jako LOS (lipooligosacharyd). Część cukrowa LPS typowo zbudowana jest z dwóch części: oligosacharydu rdzeniowego i polisacharydu zwanego też antygenem O. LPS silnie oddziałuje z komórkami układu immunologicznego odpowiadając za toksyczne efekty obserwowane w trakcie gram-ujemnej bakteriemii i sepsy. Za większość aktywności biologicznych odpowiedzialnych za toksyczność LPS odpowiada Lipid A. Cząsteczka LPS ze względu na swoją budowę jest amfifilowa, w wodzie tworzy skomplikowane układy micelarne, które mogą posiadać różną strukturę i wielkość. LPS można rozpuścić w niektórych rozpuszczalnikach np. dimetylosulfotlenku (DMSO) po odpowiednim przygotowaniu patent US 8,426,221. W środowisku kwaśnym i podwyższonej temperaturze LPS ulega rozpadowi z uwolnieniem lipidu A części cukrowej, która może być oczyszczona i wykorzystana do tworzenia szczepionek.

Schemat budowy LPS przedstawiono poniżej:



Koncepcja uzyskania odporności na patogeny gram-ujemne poprzez wzbudzenie przeciwciał skierowanych na antygen O-swoisty lipopolisacharydu została zaproponowana przez Robbins et al., 1992.

Ze względu na słabą immunogenność LPS i brak aktywacji limfocytów T, uzyskanie dobrej odpowiedzi wiąże się z koniecznością tworzenia koniugatów O-antygenów z białkiem nośnikowym podobnie jak w przypadku szczepionek już stosowanych u ludzi przeciwko *H. influenza*, *pneumococcus*,

meningococcus, które zawierają koniugaty polisacharydów kapsularnych z białkiem. Oligosacharydy uzyskane w wyniku enzymatycznej hydrolizy LPS z *Salmonella typhimurium* skoniugowane z białkiem nośnikowym wzbudzały silną odpowiedź na antygeny cukrowe u myszy i królików (Swenson i Lindberg, 1981; Swenson i wsp., 1979).

Kolejne prace koncentrowały się na szczepionkach glikokoniugatowych opartych na antygenach O-swoistych, które dawały skuteczną protekcję w modelach zwierzęcych. Obecnie szereg szczepionek przeciwko patogenom gram-ujemnym opartych na powyższej koncepcji (*S. paratyphi* A, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella*) przeszło lub jest w trakcie badań klinicznych (Konadu i wsp., 2000, Levine i wsp., 2007; Ahmed i wsp., 2006).

Wadą szczepionek opartych na antygenie O-swoistym jest ograniczona reaktywność uzyskiwanych przeciwciał – ograniczona do szczepów danego serotypu.

Zakażenia bakteriami gram-ujemnymi stanowią też duży problem dla hodowców zwierząt, zwłaszcza w produkcji drobiu, trzody chlewnej i bydła. Główne gatunki bakterii gram-ujemnych odpowiedzialnych za straty w produkcji zwierzęcej to *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*. Obecnie globalny rynek szczepionek dla zwierząt w 2016 roku osiągnął wartość 5,81 mld USD i szacuje się, że jego wartość wzrośnie do poziomu 7,68 mld USD w 2021 roku. Skumulowany roczny wskaźnik wzrostu (CAGR) w latach 2016–2021 wyniesie 5,7%.

Szczepionki weterynaryjne w większości stanowią zabite bądź atenuowane komórki bakteryjne szczepów najczęściej powodujących zakażenia. Przykładowo szczepionka Coliprotect F4/F18 produkowana przez (Prevtec Microbia GmbH) składa się z dwóch szczepów żywych bakterii *E. coli* (O8:K87 oraz O141:K94), które nie produkują toksyn powodujących choroby. Inne zawierają białka bakteryjne stanowiące czynniki wirulencji takie jak adhezyny i toksoidy (Porcilis Porcoli Diluvac Forte produkowany przez Intervet International B.V.; Nobilis E.Coli produkowany przez: Intervet International B.V.). Szczepionki weterynaryjne koniugatowe są na razie w fazie badań laboratoryjnych, nie stosuje się też w weterynarii szczepionek opartych na LPS. Wadą aktualnych szczepionek jest ich swoistość serotypowa ograniczona do szczepów użytych do immunizacji. Zastosowanie LPS jako antygeny pozawala na uzyskanie szczepionek zarówno o wąskiej jak i szerszej swoistości.

Antygen O stanowi najbardziej zmienną część LPS, unikalną dla danego serotypu, w związku z czym jest jednym z kluczowych antygenów dla określania serotypów bakterii. Oligosacharydy rdzeniowe posiadają znacznie bardziej konserwatywną strukturę np. w obrębie gatunku *E. coli*, wszystkie serotypy posiadają jeden z pięciu typów oligosacharydu rdzeniowego zaś u bakterii z rodzaju *Salmonella* zidentyfikowano dotychczas 1 typ oligosacharydu rdzeniowego. LPS stanowi główny składnik zewnętrznej błony ściany komórkowej bakterii gram-ujemnych, jest zatem jednym z głównych antygenów na powierzchni komórki i potencjalnym celem dla szczepionek.

Szczepionki, w których wykorzystuje się wyizolowane, oczyszczone antygeny określa się mianem szczepionek podjednostkowych, ich zaletą jest silna indukcja odpowiedzi na wybrany antygen co w przypadku tak złożonego immunogenu jakim jest cała komórka bakteryjna nie zawsze jest możliwe ze względu na kompetycję antygenową między różnymi cząsteczkami na jej powierzchni. Inne zalety to ściśle określony, powtarzalny skład, mniejsza ilość reakcji ubocznych, ukierunkowanie odpowiedzi na antygeny zapewniające ochronę.

Lipopolisacharydy, podobnie jak polisacharydy i oligosacharydy są słabymi immunogenami, stanowią zatem hapteny, które dopiero po sprzęgnięciu z nośnikiem białkowym uzyskują zdolność do indukcji przeciwciał klasy IgG i pamięci immunologicznej niezbędnej dla uzyskania dobrej ochrony. Tworzenie koniugatów LPS białko wymaga częściowej dekompozycji LPS w celu uwolnienia rozpuszczalnej w wodzie części cukrowej. W wyniku kwaśnej hydrolizy lipopolisacharydu dochodzi do jego rozszczepienia w miejscu połączenia wewnętrznej części oligosacharydu rdzeniowego zawierającego zwykle cząsteczki kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (KDO) z lipidem A. Uwolniona część cukrowa LPS jest następnie oczyszczana i sprzęgana z białkiem nośnikowym. Istnieje szereg sposobów sprzęgania oligo i polisacharydów z białkami znanych osobom biegłym w dziedzinie. Najczęściej sprzęganie przebiega w dwóch etapach: aktywacji sacharydu i koniugacji z białkiem. Często stosuje się sprzęganie poprzez reduktywną aminację pomiędzy terminalnymi grupami ketozowymi lub aldehydowymi sacharydu i grupami aminowymi białek w obecności czynnika redukującego, zwykle cyjanoborowodoru sodu. Bez względu na zastosowaną metodę kluczowym etapem jest hydroliza LPS w celu uwolnienia części cukrowej. Pomimo stosunkowo łagodnych warunków reakcji, degradacji ulega wewnętrzna część rdzenia zbudowana z KDO, dochodzi także do uwolnienia i utraty znacznej części podstawników niecukrowych, które są istotne dla właściwości antygenowych LPS jako elementy epitopów.

Sposób opisany w wynalazku umożliwia uzyskanie kompleksu w sposób nie powodujący degradacji i innych modyfikacji chemicznych LPS zachowując w pełni jego cechy antygenowe. Wynalazek opisuje sposób sprzęgania LPS z białkami, w którym nie ma konieczności częściowej degradacji LPS, sprzęganie nie wymaga wytworzenia kowalencyjnego połączenia pomiędzy LPS i białkiem co również może prowadzić do modyfikacji i utraty niektórych epitopów. Sprzęganie polega na wytworzeniu niekowalencyjnego kompleksu pomiędzy LPS i białkiem w kilkuetapowym procesie. W pierwszym etapie LPS podlega procedurze usuwania kationów metali z nim związanych i wymianie na protony przez co uzyskuje się kwaśną formę LPS, dobrze rozpuszczalną w DMSO, w analogicznym procesie uzyskuje się białko, w którym wszystkie jonowo związane kationy zostają zamienione na protony. Następnie LPS i białko rozpuszcza się w DMSO i miesza ze sobą oba roztwory, uzyskując mieszaninę LPS białko w DMSO w pożądanym stosunku wagowym. W dalszej kolejności DMSO stopniowo rozcieńcza się wodą i usuwa DMSO w procesie dializy, ultrafiltracji lub filtracji żelowej. Kompleks może następnie być użyty do formułacji immunogenu lub szczepionki z dowolnym adiuwantem.

Wynalazek charakteryzuje się tym, że powstały kompleks jest zdolny do indukcji odpowiedzi immunologicznej o charakterystyce typowej dla antygenów typu TH2 tj. z przełączaniem klas przeciwciał, w wyniku czego dochodzi do syntezy przeciwciał IgG, IgA podczas gdy odpowiedź pierwotna charakteryzuje się produkcją przeciwciał klasy IgM i pamięcią immunologiczną, zawiera kompletną cząsteczkę LPS, nie wywołuje efektów toksycznych u szczepionych zwierząt w dawkach stosowanych do immunizacji. Korzystnie, zawarty w kompleksie lipid A będący składnikiem LPS posiada własności immunostymulujące zapewniając silną odpowiedź immunologiczną.

Sposób uzyskiwania szczepionki składa się z następujących etapów:

- a) hodowli komórek bakteryjnych;
- b) izolacji LPS;
- c) przeprowadzenia LPS w postać rozpuszczalną w DMSO;
- d) wytworzeniu kompleksu poprzez zmieszanie roztworów LPS i białka w DMSO i zmiany rozpuszczalnika na wodę;
- e) liofilizacji lub formułacji z adiuwantem.

Uzyskany kompleks można podawać iniekcyjnie bez adiuwanta lub w formułacji z dodatkowym adiuwantem zapewniającym efekt depozycji np. z olejem mineralnym. Wyniki eksperymentów wskazują, że uzyskiwane kompleksy są zdolne do indukcji wysokiego miana przeciwciał klasy IgG swoistych względem LPS-u zastosowanego do szczepienia oraz przeciwciał swoistych względem białka nośnikowego, co świadczy o odpowiedniej aktywacji limfocytów T. Ze względu na bardzo zbliżone właściwości fizykochemiczne LPS metoda jest uniwersalna i umożliwia przygotowanie immunogenu z LPS izolowanego z dowolnego szczepu bakterii gram-ujemnej. W reakcji na immunogen powstają również przeciwciała skierowane przeciwko zastosowanemu białku nośnikowemu, dzięki czemu można śledzić postęp immunizacji w przypadku występowania rezydualnego poziomu przeciwciał na LPS danej bakterii w wyniku ekspozycji środowiskowej i transferu przeciwciał z organizmu rodzicielskiego. Jest to istotne w przypadku szczepionek weterynaryjnych, gdzie wymagany jest tzw. marker.

Równocześnie stwierdzono brak toksyczności zastosowanych immunogenów w testach szczepienia myszy szczepu Balb/C. Dawka LPS-u wynosiła ok. 1,1 mg/kg masy ciała. Jest to dawka 5-krotnie niższa od dawki śmiertelnej dla świń (5 mg/kg masy ciała). Preparaty szczepionkowe były też testowane na liniach komórkowych, gdzie również nie wykazano ich toksyczności.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kompleksów immunologicznych lipopolisacharyd bakteryjny (LPS)/białko, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) izoluje się z bakterii LPS dowolną metodą, następnie przeprowadza w formę dobrze rozpuszczalną w DMSO poprzez usuwanie kationów metali związanych z LPS oraz ich wymianę na protony, przeprowadzając lipopolisacharyd bakteryjny w formę kwaśną;
- b) uzyskuje się białko dobrze rozpuszczalne w DMSO, przy czym wszystkie jonowo związane kationy zostają zamienione na protony;
- c) rozpuszcza się LPS i białko w DMSO i miesza ze sobą oba roztwory uzyskując mieszaninę LPS białko w DMSO w określonym stosunku wagowym; po czym
- d) stopniowo rozcieńcza się i usuwa DMSO,

przy czym nie doprowadza się do degradacji i modyfikacji chemicznej LPS, zachowując kompletną cząsteczkę LPS i jej właściwości antygenowe, a sprzęganie LPS z białkiem następuje w sposób nie kowalencyjny.

Korzystnie sposób charakteryzuje się tym, że LPS pochodzi z dowolnego szczepu bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia*, *Hafnia*, *Salmonella* i *Campylobacter*.

Korzystnie sposób charakteryzuje się tym, że zastosowane w kompleksie białko może być dowolnym białkiem o właściwościach immunogennych, rozpuszczalnym w DMSO.

Korzystnie sposób charakteryzuje się tym, że zastosowane w kompleksie białko jest kazeiną lub albuminą surowicy bydlęcej.

Korzystnie sposób charakteryzuje się tym, że DMSO rozcieńcza się wodą.

Bardziej korzystnie sposób scharakteryzuje się tym, że DMSO usuwa się za pomocą dializy, ultrafiltracji lub filtracji żelowej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompleks lipopolisacharyd/białko wytworzony powyższym sposobem do zastosowania do indukcji odpowiedzi immunologicznej.

Korzystnie kompleks lipopolisacharyd/białko jest do zastosowania przy wytwarzaniu immunogenu lub przeciwbakteryjnej szczepionki weterynaryjnej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki weterynaryjnej zawierającej kompleks immunologiczny LPS/białko obejmujący następujące etapy: hoduje się komórki bakteryjne, izoluje się LPS, charakteryzujący się tym, że przeprowadza się LPS w formę rozpuszczalną w DMSO poprzez usuwanie kationów metali związanych z LPS i ich wymianę na protony, uzyskuje się białko rozpuszczalne w DMSO, w którym wszystkie jonowo związane kationy zostają zamienione na protony, przy czym rozpuszcza się LPS i białko w DMSO a następnie miesza otrzymane roztwory do wytworzenia niekowalencyjnego kompleksu wykazującego immunogenność, przy czym rozcieńczalnikiem zastosowanym do usunięcia DMSO z preparatu jest woda.

Korzystnie LPS izoluje się metodą ekstrakcji fenol – woda.

Korzystnie DMSO usuwa się w procesie dializy, ultrafiltracji lub filtracji żelowej.

Korzystnie uzyskany preparat poddaje się liofilizacji lub formuluje z dowolnym adiuwantem.

Jeszcze kolejnym przedmiotem wynalazku jest szczepionka weterynaryjna zawierająca kompleks wytworzony sposobem opisanym powyżej.

Korzystnie szczepionka jest w postaci zliofilizowanej.

Korzystnie, szczepionka jest w postaci formułacji z adiuwantem olejowym takim jak niekompletny adiuwant Freund.

Korzystnie białko nośnikowe kompleksu stanowi marker pozwalający na śledzenie postępu immunizacji u osobnika.

Korzystnie szczepionka wykazuje szerokie spektrum działania wobec wszystkich wersji LPS (serotypów) spotykanych w szczepach *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Hafnia alvei*.

Korzystnie szczepionka pobudza swoistą odpowiedź humoralną u osobnika powodując wzrost przeciwciał anty LPS klasy IgG.

Korzystnie osobnikami immunizowanymi mogą być ptaki i ssaki, takie jak kury i świny.

Korzystnie immunizacja następuje przez podanie domięśniowo lub dootrzewnowo.

Korzystnie szczepionka nie wywołuje efektów toksycznych u szczepionych zwierząt.

Korzystnie szczepionka zawiera kompleks LPS z białkiem w PBS i opcjonalnie dowolny inny adiuwant.

Problemem technicznym rozwiązywanym przez wynalazek jest uzyskanie innowacyjnej szczepionki, która nie była dotychczas stosowana w weterynarii. Wynalazek wyróżnia się tym, że opisaną technologią można w łatwy sposób uzyskać immunogenne kompleksy LPS białko. Obecność białka w kompleksie zapewnia odpowiedź typu TH2 co jest pożądane w przypadku szczepionek. Przy tym do uzyskania kompleksu nie jest konieczne chemiczne sprzęganie LPS z białkiem jak ma to miejsce w przypadku znanych szczepionek. Nieoczekiwanie, odpowiedź na LPS po immunizacji takim kompleksem jest bardzo silna i przewyższa odpowiedź na LPS w przypadku immunizacji zabitymi komórkami bakterii. Szczepionki zawierające cały, niezmodyfikowany LPS wykazują szersze spektrum działania. Stanowi to ulepszenie w stosunku do szczepionek opartych na antygenie O, których reaktywność uzyskiwanych przeciwciał ograniczona jest do szczepów danego serotypu. W przypadku szczepionek ujawnionych w niniejszym wynalazku reaktywność przeciwciał uzyskanych w wyniku immunizacji kompleksami LPS/białko zastosowanymi w tych szczepionkach jest swoista do wszystkich wersji LPS spotykanych w szczepach *E. coli* co zapewnia skuteczność szczepionki w stosunku do wszystkich serotypów *E. coli* spotykanych w środowisku. Szeroka reaktywność jest uzyskiwana poprzez zastosowanie w kompleksach mieszaniny szorstkich lipopolisacharydów reprezentujących wszystkie 5 typów rdzenia znanych u *E. coli*. Podobnie

w przypadku *Salmonella*, u której występuje 1 typ rdzenia, zastosowanie szorstkiego LPS zapewnia reaktywność na wszystkie serotypy *Salmonella*.

Załączone figury przedstawiają: Fig. 1 przedstawia krzywą standardową na LPS *Salmonella* R60 w zakresie 0–100 µg LPS, Fig. 2 przedstawia poziom przeciwciał IgG anty-LPS *Salmonella* w surowicy kur, zaś Fig. 3 przedstawia poziom przeciwciał IgG anty-białko nośnikowe w surowicy kur.

Wynalazek został przedstawiony szczegółowo w przykładach wykonania, które jednak nie ograniczają jego zakresu.

Przykłady wykonania

Przykład 1. Izolacja LPS

Lipopolisacharydy ze szczepów bakteryjnych: *Hafnia alvei* 1216, *Hafnia alvei* 1286, *Escherichia coli*: F470, F576, F653, F2513, W3100 i *Escherichia coli* K12 C600 (K-12) *Salmonella minnesota* R60, *Campylobacter jejuni* izolowano metodą ekstrakcji fenol-woda zgodnie z publikacją Westphala i Jann, New York: Academic Press Inc.; 1965(5):83–91.

Suchą masę bakteryjną zawieszano w wodzie w stosunku 5 g masy bakteryjnej na 100 ml wody, następnie zawiesinę mieszano z jednakową objętością 90% fenolu ogrzanego do temp. 65°C i mieszano w tej temperaturze w łaźni wodnej przez 15 min. Po ostygnięciu mieszaninę wirowano w celu separacji faz (5000 × g, 20 min), fazę wodną zebrano, fazę fenolową uzupełniono czystą wodą do poprzedniej objętości i powtórnie ekstrahowano w temp. 65°C. Materiał wirowano tak jak poprzednio, zebrano fazę wodną i powtórzono proces ekstrakcji z kolejną porcją wody. Połączone fazy wodne dializowano w worku dializacyjnym (masa odcięcia 12 kDa) do utraty zapachu fenolu. Dializat poddano wirowaniu (5000 g, 10 min) w celu usunięcia wytrąconych cząstek, następnie LPS osadzono przez ultrawierowanie (100 000 × g, 2 h). Osad LPS zawieszono w 0,2 M NaCl (25 mg LPS/ml) dodano nukleaz (RNaza i DNaza) w ilości 50 µg/ml, mieszaninę inkubowano przez 2 h w temp. 37°C. Następnie LPS poddano 2-krotnemu ultrawierowaniu w wodzie w celu usunięcia fragmentów kwasów nukleinowych i nukleotydów. Czystość preparatu (brak obecności kwasów nukleinowych) kontrolowano spektrofotometrycznie, nieobecność szczytu przy długości fali 260 i 280 nm świadczył o braku zanieczyszczeń białkami i kwasami nukleinowymi.

Przykład 2. Przygotowanie LPS rozpuszczalnego w DMSO

50 mg LPS rozpuszczono w 2 ml 2% SDS z dodatkiem EDTA (50 µl 0,5 M r-ru), odwirowano w celu usunięcia nierozpuszczalnych zanieczyszczeń (16 000 × g przez 5 min) i strącono 4 objętościami etanolu. Materiał odwirowano (16 000 × g przez 30 min), supernatant zebrano i odrzucono, osad zawieszono w etanolu (95%) i odwirowano (16 000 × g przez 30 min), krok powtórzono. Osad rozpuszczono w 2 ml wody i przepuszczono przez kolumnkę wypełnioną złożem jonowymieniacza Dowex 50Wx8 w formie kwaśnej. Kolumnkę płukano wodą, zebrano frakcje wykazujące kwaśne pH, połączono i zliofilizowano. Procedurę zastosowano w przypadku LPS z *E. coli*: F470, F576, F653, F2513, W3100 i *E. coli* K12 C600.

Przykład 3. Przygotowanie LPS *E. coli* rozpuszczalnego w DMSO

20 mg LPS z *E. coli* K12 C600 rozpuszczono w 4 ml 2% SDS, następnie przepuszczono przez kolumnkę wypełnioną złożem Chelex 100, kolumnkę płukano wodą, zebrano frakcję zawierającą LPS (obecność LPS wykrywano testem kolorymetrycznym fenol, kwas siarkowy). LPS strącono 4 obj. etanolu i odzyskano przez wirowanie (16 000 g przez 30 min), supernatant zebrano i odrzucono, osad zawieszono w etanolu (95%) i odwirowano (16 000 g przez 30 min), krok powtórzono. Osad rozpuszczono w 2 ml wody i przepuszczono przez kolumnkę wypełnioną złożem jonowymieniacza Dowex 50Wx8 w formie kwaśnej. Kolumnkę płukano wodą, zebrano frakcje LPS wykazujące kwaśne pH, połączono i zliofilizowano. Procedurę tę zastosowano także do uzyskania kwaśnych form LPS: *Hafnia alvei* 1216, *Hafnia alvei* 1286.

Przykład 4. Przygotowanie LPS *Salmonella minnesota* rozpuszczalnego w DMSO

60 mg LPS *Salmonella minnesota* R60 zawieszono w wodzie (10 ml) i dodano 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0. Materiał przeniesiono do worka dializacyjnego (masa odcięcia 12 kDa) i dializowano do wody w celu usunięcia EDTA. Materiał po dializie zebrano do próbówki typu Falcon (50 ml) dodano 2 ml zawiesiny złoża Dowex 50Wx8 w formie kwaśnej, inkubowano przez 1 godzinę na rotatorze serologicznym po czym odwirowano na rotorze wychylnym (5000 × g przez 5 min), zebrano fazę wodną i zliofilizowano.

Powyższe metody z przykładów 2–4 przedstawiające przygotowanie LPS z komórek bakteryjnych stanowią metody alternatywne i równoważne, podstawą ich zastosowania jest usunięcie z LPS jonów

metali dwuwartościowych i następnie przeprowadzenie go w formę kwaśną, co jest niezbędnym etapem procedury. Metody te mogą być stosowane zamiennie dla dowolnych lipopolisacharydów izolowanych z różnych bakterii. Wybór techniki nie zależy od pochodzenia i budowy lipopolisacharydu.

P r z y k ł a d 5. Przygotowanie kompleksu LPS *Salmonella* R60/kazeina z mleka krowiego

20 mg LPS rozpuszczalnego w DMSO rozpuszczono w 2 ml DMSO. 10 mg kazeiny mleka krowiego rozpuszczono w 2 ml DMSO, zawiesinę lekko sonikowano, aż do uzyskania klarownego roztworu. Roztwory zmieszano i inkubowano przez noc z mieszaniem w temp. pokojowej. Następnie mieszaninę powoli rozcieńczano wodą stale mieszając. Tempo dodawania wody ustalono tak by uniknąć wzrostu temperatury mieszaniny o więcej niż 10°C. Po osiągnięciu stosunku 1 : 1 mieszaninę przeniesiono do worka dializacyjnego i dializowano do wody, aż do usunięcia DMSO.

Materiał przeniesiono do próbówki wirówkowej i odwirowano celem odzyskania kompleksu LPS/białko (16 000 × g, przez 20 min). Kompleks zebrano i rozpuszczono w PBS. Następnie przeprowadzono badanie zawartości LPS w obu frakcjach: supernatancie i kompleksie metodą kolorymetryczną wykorzystującą fenol i kwas siarkowy jak opisano w DuBois M. i inni. „Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances” Anal. Chem., 1956, 28 (3), str. 350–356.

W tym celu wykonano krzywą standardową na LPS *Salmonella* R60 w zakresie 0–100 µg LPS (przedstawioną na Fig. 1) i oznaczono zawartość LPS w obu frakcjach, wykazano, że 66,2% LPS znajdowało się we frakcji zawierającej kompleks.

P r z y k ł a d 6. Przygotowanie kompleksów LPS *Salmonella* R60/kazeina i *H. alvei* 1216/kazeina, *H. alvei* 1286/ kazeina z mleka krowiego

Każdą z próbek 10 mg LPS w formie rozpuszczalnej w DMSO, rozpuszczono w 1 ml DMSO i zmieszano z 1 ml DMSO zawierającym rozpuszczoną kazeinę mleka krowiego. Roztwory inkubowano przez noc z mieszaniem w temp. pokojowej. Następnie mieszaniny powoli rozcieńczano wodą stale mieszając, tempo dodawania wody ustalono tak by uniknąć wzrostu temperatury mieszaniny o więcej niż 10°C. Po osiągnięciu stosunku 1 : 1 mieszaniny przeniesiono do worków dializacyjnych i dializowano do wody, aż do usunięcia DMSO. Materiał przeniesiono do próbówki wirówkowej i odwirowano celem odzyskania kompleksu LPS/białko (16 000 × g przez 20 min). Kompleksy zebrano i rozpuszczono w PBS, obecność LPS potwierdzono metodą kolorymetryczną.

P r z y k ł a d 7. Przygotowanie kompleksów LPS *E. coli*: F470, F576, F653, F2513 i K12 z kazeiną z mleka krowiego

Próbki po 50 mg LPS *E. coli*: F470, F576, F653, F2513 i K12 rozpuszczono w 5 ml DMSO i zmieszano z 5 ml DMSO zawierającego 50 mg kazeiny mleka krowiego. Roztwory inkubowano przez noc z mieszaniem w temp. pokojowej. Następnie mieszaniny powoli rozcieńczano wodą stale mieszając, tempo dodawania wody ustalono tak by uniknąć wzrostu temperatury mieszaniny o więcej niż 10°C. Po osiągnięciu stosunku 1 : 1 mieszaniny przeniesiono do worków dializacyjnych i dializowano do wody, aż do usunięcia DMSO. Materiał przeniesiono do próbówki wirówkowej i odwirowano celem odzyskania kompleksu LPS/białko (16 000g przez 20 min). Kompleksy zebrano i rozpuszczono w PBS, obecność LPS potwierdzono metodą kolorymetryczną.

P r z y k ł a d 8. Przygotowane białka albuminy surowicy bydłej (BSA) rozpuszczalnego w DMSO

100 mg BSA rozpuszczono w 10 ml wody, dodano 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 i dializowano w worku dializacyjnym w celu usunięcia EDTA. Następnie roztwór białka przepuszczono przez kolumnę upakowaną złożoną z Dowex 50Wx8, kolumnę płukano wodą, zebrano frakcje zawierającą białko i zliofilizowano.

P r z y k ł a d 9. Przygotowanie kompleksu LPS *Salmonella*/BSA

10 mg BSA uzyskanego w przykładzie 8 rozpuszczono w 2 ml DMSO, osobno rozpuszczono 10 mg LPS *Salmonella* R60 w 1 ml DMSO. Oba roztwory zmieszano i inkubowano przez noc z mieszaniem w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę stopniowo rozcieńczano wodą w stosunku 1 : 1 stale mieszając, tempo dodawania wody ustalono tak, aby uniknąć wzrostu temperatury mieszaniny o więcej niż 10°C. Rozcieńczoną mieszaninę przeniesiono do worka dializacyjnego i dializowano do wody aż do usunięcia DMSO i następnie do PBS.

P r z y k ł a d 10. Immunizacja myszy kompleksem *Hafnia alvei* 1216/kazeina z mleka krowiego

Myszy szczepu Balb/c immunizowano kompleksem *Hafnia alvei* 1216/kazeina w PBS w ilości opowiadającej 20 µg LPS na dawkę. Kompleks podawano bez dodatkowego adiuwantu dootrzewnowo. Zwierzęta były immunizowane 3-krotnie w odstępach 3 tygodniowych. Grupom kontrolnym podano sam LPS albo samą kazeinę (20 µg na mysz). 10 dni po ostatnim szczepieniu pobrano próbki krwi,

przygotowano surowicę, którą analizowano testem ELISA pod kątem reaktywności z antygenem użytym do immunizacji. Miano surowic na LPS *Hafnia alvei* 1216 przedstawiono w tabeli poniżej.

Miano przeciwciał przeciwko LPS *Hafnia alvei* w surowicy myszy przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1

	miano (rozcieńczenie surowicy przy którym odczyt OD ₄₅₀ wynosi 0,2 ponad poziom tła (IU/ml))			
	przed szczepieniem	po 1 szczepieniu	po 2 szczepieniu	po 3 szczepieniu
mysz 1	148	17442	34183	49149
mysz 2	304	11576	5757	10548
mysz 3	222	3124	6157	3961
mysz 4	219	14629	19108	97137
mysz 5	256	1301608	523436	1665934

Przykład 11. Badanie immunogenności kompleksu LPS *Salmonella* R60/kazeina z mleka krowiego u kur.

5 kur niosek immunizowano 2-krotnie w miesiąc piersiowy kompleksem LPS *Salmonella* R60/kazeina w ilości 200 µg kompleksu w PBS bez dodatkowego adiuwantu. Przed immunizacją pobrano próbki krwi. Odstęp między szczepieniami wynosił 3 tygodnie. Po 14 dniach od 2 szczepienia pobrano ponownie próbki krwi. Surowice analizowano testem ELISA badając szereg rozcieńczeń surowicy, miano skalkulowano na podstawie uzyskanych krzywych, definiując jako największe rozcieńczenie, przy którym sygnał wynosi $\geq 0,2$ jednostki ponad poziom tła. Miano surowic przedstawiono w tabeli poniżej.

Miano przeciwciał IgG w surowicach kur w odpowiedzi na podanie kompleksu LPS *Salmonella* R60/kazeina przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2

	miano IgG przed szczepieniem	miano IgG 2 tyg po drugim szczepieniu
Kura 1	1715	2696
Kura 2	898	1107
Kura 3	2234	2521
Kura 4	1148	2429
Kura 5	1392	5517
średnia	1477	2854

Przykład 12. Badanie efektywności szczepionki u kur zakażanych eksperymentalnie bakteriami *Salmonella*.

W badaniu immunizowano 6-tygodniowe kury kompleksem LPS *Salmonella minnesota*/kazeina z zastosowaniem adiuwantu olejowego (niekompletny adiuwant Freund). Kury były podzielone na grupy: kontrolną, grupa A (nieszczepiona) i dwie grupy badane szczepione różną ilością kompleksu: grupa B – 50 µg kompleksu, grupa C – 150 µg kompleksu. Zwierzęta immunizowano dwiema dawkami w odstępie 4 tygodni. Po drugim szczepieniu zwierzęta poddano eksperymentalnemu zakażeniu polowym izolatem *Salmonella*. Zakażenie wykonano 2-krotnie 28 i 62 dniu po drugim szczepieniu. Około tydzień po ostatnim zakażeniu zwierzęta poddano eutanazji i pobrano do badań mikrobiologicznych narządy: wątrobę, torebkę Fabrycjusza, śledzionę oraz próbki krwi i wymazu z kloaki.

Wyniki analizy organów zebrano w poniższej Tabeli 3. Wyniki badania mikrobiologicznego narządów immunizowanych kur. (-) – brak obecności bakterii *Salmonella* w narządzie, (+) – obecność bakterii *Salmonella* w narządzie.

Tabela 3

Tabela 3		Pobranie materiału w dniu zakończenia eksperymentów				Pobranie materiału przed zakażeniem eksperymentalnym	Pobranie materiału po wprowadzeniu kurcząt do kurnika
		wątroba	śledziona	torba Fab.	Kloaka	Kloaka	Kloaka
Kontrola	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	7	+	+	-	-	-	-
	8	+	+	+	-	-	-
	9	+	-	-	-	-	-
	10	+	+	-	-	-	-
Grupa A	11	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-
	16	+	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-
	20	+	+	-	-	-	-
Grupa B	21	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-
	24	+	-	-	+	-	-
	25	-	-	+	-	-	-
	26	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-	-
	30	+	+	+	-	-	-

Wymazy z kloaki pobrane 1, 56 i 98 dnia nie wykazały obecności *Salmonelli* w tym narządzie. Testowano również obecność *Salmonelli* w organach pobranych od ptaków po uboju (dzień 98). W przypadku wątroby kur nieszczepionych obecność bakterii potwierdzono u 60% kur, w grupach kur szczepionych –

20%. Podobnie, w przypadku testowania obecności *Salmonelli* w śledzienie – 30% u kur nieszczepionych a 10% w grupach kur zaszczepionych.

W celu sprawdzenia immunogenności przygotowanych preparatów, metodą ELISA wykonano analizę poziomu przeciwciał klasy IgG w surowicy kur po szczepieniu (Fig. 2 – LPS *Salmonella* oraz Fig. 3 – białko nośnikowe).

Potwierdzono istotny wzrost przeciwciał skierowanych przeciw LPS *Salmonella* oraz białku nośnikowemu.

Przykład 13. Badanie efektywności szczepionki na świniach

Badania miały na celu zbadanie aktywności opracowanej szczepionki przeciwko kolibakteriozie i potwierdzenie jej skuteczności w zapobieganiu tej chorobie u prosiąt. W badaniach wykorzystano ogółem 9 loch oraz 27 prosiąt będących potomkami tych loch (po 3 szt. z miotu). W eksperymencie utworzono 3 grupy doświadczalne po 3 szt. loch w każdej grupie.

W celu uzyskania materiału zwierzęcego do badań zakupiono 26 loszek hybrydowych DanBred z hodowli duńskiej. DanBred Hybrid jest pierwszą krzyżówką DanBred Landrace i DanBred Yorkshire. Jest to optymalna rasa mateczna, która zapewnia wysoką wydajność produkcji poprzez połączenie najlepszych cech.

Badane grupy:

Gr. D – lochy szczepione dwukrotnie szczepionką doświadczalną i ich prosięta zakażane dawką zakaźną *E. coli* szczep F4 (K88) produkujący toksynę Stx2e (1×10^9 CFU/1 ml w objętości 5 ml/prosię).

Gr. K1 – lochy nieszczepione, zakażone prosięta identycznie jak prosięta z grupy D.

Gr. K2 – lochy i prosięta nieszczepione, lochy i prosięta tej grupy nie były zakażane celowo, do zakażeń w tej grupie dochodziło samoistnie podobnie jak ma to miejsce na fermach.

Szczepienie wykonywano preparatem (300 µg na dawkę) będącym równowagową mieszaniną kompleksów przygotowanych zgodnie z przykładem 5 zawierającą łącznie 150 µg LPS (całkowity LPS) na dawkę. Kompleks podawano z adiuwantem olejowym (niekompletny adiuwant Freund'a).

Skład mieszaniny do immunizacji (pojedyncza dawka):

0,5 ml mieszaniny kompleksów LPS/kazeina w PBS zawierająca łącznie 150 µg LPS;

0,5 ml niekompletnego adiuwantu Freund'a.

Ciężarne lochy szczepiono domięśniowo, w odstępach 3-tygodniowych (8 i 11 tydzień ciąży).

Prosięta zakażano w 7 dniu życia. Następnie prowadzono obserwacje kliniczne, pomiar temperatury, kontrolę zdrowia oraz oceniano wyniki produkcyjne na podstawie przyrostów masy ciała. Prosięta poddano eutanazji w 21 dniu życia, pobrano materiał do badań histopatologicznych: próbki jelita czczego, dwunastnicy, jelita biodrowego i okrężnicy. Te same próbki stanowiły materiał do badań mikrobiologicznych.

Poziom przeciwciał analizowano w surowicy szczepionych loch, prosiąt i siarze.

Wyniki badań

Najczęściej notowanym objawem zakażenia była biegunka obserwowana z różnym nasileniem we wszystkich badanych grupach.

Tabela 4 poniżej przedstawia obserwacje kliniczne prosiąt poddanych eksperymentalnemu zakażeniu. Prosięta zostały zakażone w 7 dobie życia zawiesiną bakterii w dawce 1×10^6 CFU/1 ml w objętości 5 ml/prosię. Odsetek prosiąt z określonymi objawami i odsetek padnięć został wyliczony jako procent z liczby prosiąt wyjściowych tj. na dzień przed zanotowanym objawem. Objasnienia skrótów: A – zeszywnienie ciała i apatia, brak apetytu; B – biegunka; C – utrata masy ciała; K – kulawizna; U – śmierć zwierzęcia (padnięcie).

Tabela 4

Grupa	Wyjściowa liczba prosiąt	kod objawu	Dni po zakażeniu eksperymentalnym													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
K1	35	A	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		B	16 (45,71)	5 (15,15)	6 (18,18)	11 (35,45)	9 (30,00)	8 (26,56)	4 (15,38)	3 (12,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		C	7 (20,00)	4 (12,12)	4 (12,12)	6 (19,35)	6 (20,00)	4 (15,33)	4 (15,38)	0 (0,00)	1 (4,00)	1 (4,00)	1 (4,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (4,16)
		K	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		U	2 (5,71)	0 (0,00)	2 (6,06)	1 (3,12)	0 (0,00)	4 (12,9)	1 (3,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (4,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
K2	37	A	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		B	25 (67,56)	22 (59,45)	14 (37,83)	5 (13,88)	1 (2,77)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		C	16 (43,24)	23 (62,16)	24 (64,86)	16 (44,44)	8 (22,22)	7 (21,21)	7 (21,21)	2 (5,15)	3 (9,09)	2 (6,25)	1 (3,12)	0 (0,00)	1 (3,12)	0 (0,00)
		K	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		U	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,70)	0 (0,00)	3 (8,33)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,03)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
D	34	A	0 (0,00)	1 (2,94)	1 (3,03)	3 (9,09)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		B	23 (67,64)	14 (41,17)	6 (18,18)	4 (12,12)	1 (3,03)	1 (3,03)	2 (6,06)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,12)	1 (3,12)	1 (3,12)
		C	15 (44,11)	10 (29,41)	10 (30,30)	4 (12,12)	3 (9,09)	3 (9,09)	2 (6,06)	2 (6,25)	1 (3,12)	1 (3,12)	1 (3,12)	2 (6,24)	2 (6,24)	2 (6,24)
		K	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,12)	1 (3,12)	1 (3,12)
		U	0 (0,00)	1 (2,94)	0 (0,00)	2 (6,06)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,03)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

Śmiertelność prosiąt po 7 dniu życia (czyli po zakażeniu eksperymentalnym) była najmniejsza w przypadku zwierząt będących potomstwem loch szczepionych (sumarycznie 5,88% bez uwzględniania prosiąt padłych na skutek manipulacji podczas pobrania krwi), a największa w przypadku prosiąt zakażanych eksperymentalnie i będących potomstwem loch nieszczepionych (34,28%). Śmiertelność prosiąt będących potomstwem loch nieszczepionych i niezakażanych w ciągu 14-dniowego okresu obserwacji wynosiła (13,51%). Oznacza to redukcję padnięć o około 28% w stosunku do prosiąt poddanych eksperymentalnemu zakażeniu.

Kolejne korzystne efekty szczepionki można było zaobserwować badając inne parametry, takie jak: masa i tempo przyrostu masy ciała, poziom przeciwciał, ilość bakterii w przewodzie pokarmowym.

Tabela 5 przedstawia masę ciała prosiąt doświadczalnych w poszczególnych etapach badań (kg). AB - $\alpha = 0,01$ ab - $\alpha = 0,05$; * średnie wartości cech w grupie D przyjęto za 100%.

Tabela 5

Wyszczególnienie	Miara stat.	Grupa		
		K1	K2	D
Masa ciała w 7 dniu życia	$\bar{x}$	2,02	1,83 ^B	2,16 ^A
	SD	0,285	0,207	0,154
	%*	93,5	85,9	100
Masa ciała w 14 dniu życia	$\bar{x}$	2,56 ^B	2,84 ^B	3,58 ^A
	SD	0,460	0,479	0,545
	%*	71,5	79,3	100
Masa ciała w 21 dniu życia	$\bar{x}$	3,66 ^B	3,89	4,53 ^A
	SD	0,667	0,614	0,629
	%*	80,7	85,8	100

AB - $\alpha = 0,01$ ab - $\alpha = 0,05$; *średnie wartości cech w grupie D przyjęto za 100%

Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 5 prosięta z grupy D będące potomstwem zaszczepionych loch we wszystkich okresach badań charakteryzowały się istotnie ($\alpha = 0,05$) i wysoko istotnie ($\alpha = 0,01$) wyższą masą ciała w porównaniu do prosiąt pozostałych grup.

Z analizy tempa przyrostu wynika, że prosięta od zaszczepionych loch wykazują znacząco większe przyrosty niż prosięta innych grup.

Tabela 6 przedstawia tempo przyrostu masy ciała prosiąt pochodzących od loch immunizowanych (D) i loch kontrolnych (K1 i K2).

Tabela 6

tempo przyrostu	grupa			% więcej w grupie D	
	K1	K2	D	w stos. do K1	w stos. do K2
7	119	145	194	63	33,79
14	114	150	151	32	0,67
21	123	148	173	41	16,89

Effekt ochronny koreluje z wysokim mianem przeciwciał w surowicy i siarze immunizowanych loch. Prosięta nabywały odporności biernej dzięki przeciwciałom przekazywanym w siarze co ma odzwierciedlenie w poziomie przeciwciał w surowicy prosiąt stanowiących potomstwo immunizowanych loch.

Tabela 7 przedstawia poziom przeciwciał IgG w siarze loch immunizowanych (D) i loch kontrolnych (K1 i K2).

Tabela 7

	siara		
	D	K1	K2
	109653	8408	10754
	29282	7121	14023
	142077	6073	7863
mediana	109653	7121	10754
średnia	93670	7201	10880
stosunek gr. D do K1 i K2 dla:			
mediany:		15	10
średniej:		13	9

Tabela 8 przedstawia poziom przeciwciał IgG w surowicy loch immunizowanych (D) i grupach kontrolnych (K1 i K2) na różnych etapach eksperymentu.

Tabela 8

pobr. 1				pobr. 2				pobr. 3			
lochy				lochy				lochy			
	D	K1	K2		D	K1	K2		D	K1	K2
	4231	3447	6552		49097	3083	6095		28825	2800	4892
	2891	3492	3953		15036	3205	2798		9733	4566	2253
	2725	5976	3721		20080	3746	6348		15276		3195
mediana	2891	3492	3953	mediana	20080	3205	6095	mediana	15276	3683	3195
średnia	3283	4305	4742	średnia	28071	3345	5080	średnia	17945	3683	3447
stosunek gr. D do K1 i K2 dla:				stosunek gr. D do K1 i K2 dla:				stosunek gr. D do K1 i K2 dla:			
mediany:		1,2	0,7	mediany:		6,3	3,3	mediany:		4,1	4,8
średniej:		1,3	0,7	średniej:		8,4	5,5	średniej:		4,9	5,2

Tabela 9 przedstawia poziom przeciwciał IgG w surowicy prosiąt pochodzących od loch immunizowanych (D) i grupach kontrolnych (K1 i K2) na różnych etapach eksperymentu.

Tabela 9

pobr 1				pobr 2			
prosięta				prosięta			
	D	K1	K2		D	K1	K2
	3949	769	2101		1003	649	803
	6475	5751	2718		973	1800	867
	8092	951	975		1792	450	586
	14011	916	895		4923	492	653
	7891	726	576		1864	409	989
	25976	705	603		5984	378	702
			1651				1199
			2276				681
			3870				1328
mediana	7992	843	1651	mediana	1828	471	803
średnia	11066	1636	1741	średnia	2757	696	868
stosunek gr. D do K1 i K2 dla:				stosunek gr. D do K1 i K2 dla:			
mediany:		9,5	4,8	mediany:		3,9	2,3
średniej:		6,8	6,4	średniej:		4,0	3,2

Prosięta od loch immunizowanych wykazały też zmniejszenie zasiedlenia przez szczep *E. coli* użyty do zakażenia przede wszystkim w jelicie czczym i okrężnicy.

Tabela 10 przedstawia wyniki badania mikrobiologicznego odcinków przewodu pokarmowego prosiąt stanowiących potomstwo loch immunizowanych (D) i loch kontrolnych (K1 i K2).

T a b e l a 10

ilość bakterii				% redukcji	
	K1	K2	D	w stos. do K1	w stos. do K2
w jelicie czczym	3097744,44	279222,22	86455,55	97,21	69,04
w okrężnicy	491277,77	292625	73400	85,06	74,92

Podsumowując przeprowadzony eksperyment stwierdzono, że:

Stosowany preparat pobudza swoistą odpowiedź humoralną u loch, powodując wzrost przeciwciał anty LPS *E. coli* klasy IgG. Prosięta stanowiące potomstwo immunizowanych loch nabywają odporności biernej poprzez transfer przeciwciał za pośrednictwem siary co skutkuje ich obecnością w surowicy prosiąt. Prosięta stanowiące potomstwo immunizowanych loch lepiej zniosły eksperymentalne zakażenie co ma odzwierciedlenie w szybszych przyrostach masy ciała i redukcji ilości bakterii w badanych odcinkach przewodu pokarmowego i mniejszej ilości padnięć w porównaniu do grup kontrolnych.

P r z y k ł a d 14. Procedura testu ELISA na oznaczanie poziomu przeciwciał w próbkach surowicy i siary.

- 1) Płytkę 384-dołkową opłaszczono roztworem LPS (równowagowa mieszanina LPS *E. coli* obejmująca wszystkie 5 typów rdzenia: R1, R2, R3, R4, K12). Stężenie mieszaniny LPS – 5 µg/ml w buforze do opłaszczania, po 35 µl na dołek i inkubowano przez noc.

Bufor do opłaszczania:

Proporcje: 8 ml 0,2 M Na₂CO₃ + 17 ml 0,2 M NaHCO₃ – zmieszano 32 ml Na₂CO₃ i 68 ml NaHCO₃

- 2) Następnie ręcznie usunięto cały bufor z płytki.
- 3) Płytkę trzykrotnie płukano roztworem TBS-T (TBS z 0,1% TWEEN 20) płuczką Tekan.
- 4) Następnie na płytkę nanoszono w szeregu rozcieńczeń surowicę rozcieńczoną w buforze TBS z 1% BSA, po 35 µl na dołek, pierwsze rozcieńczenie surowicy – 100×, każde kolejne: 2×.
- 5) Płytkę inkubowano w temp. 37°C przez 1 h.
- 6) Następnie ręcznie usunięto całość surowicy z płytki.
- 7) Płytkę trzykrotnie płukano roztworem TBS-T (TBS z 0,1% TWEEN 20) płuczką Tekan korzystając z programu ELISA_384_TL.
- 8) Na płytkę nanoszono koniugat przeciwciała anty IgG z HRP rozcieńczony w buforze TBS z 1% BSA, po 35 µl na dołek.
W przypadku świń: przeciwciała kozie anty świńskie IgG z Jackson ImmunoResearch w rozcieńczeniu 5000×.
- 9) Płytkę inkubowano w temp. 37°C przez 1 h.
- 10) Po godzinie usunięto cały koniugat lub roztwór przeciwciał z płytki.
- 11) Płytkę sześciokrotnie płukano roztworem TBS-T (TBS z 0,1% TWEEN 20) płuczką Tekan korzystając z programu ELISA_384_TL.
- 12) Dodano po 35 µl/dołek roztworu substratu TMB w buforze cytrynianowym (205 mM kwas cytrynowy w H₂O + KOH do pH 4,0) i rozwijano reakcję przez 20 min.
TMB (borowodorek tetrabutylamonowy – 21,1 mg, tetrametylobenzzydina – 98,54 mg, N,N-dimetyloacetamid – 10 ml).
- 13) Reakcję przerywano dodając po 35 µl na dołek roztworu 1 M H₃PO₄
- 14) Płytkę czytano w czytniku mikropłytek przy długości fali 450 nm

Publikacje:

1. Robbins, J.B., Chu, C., and Schneerson, R. (1992). Hypothesis for vaccine development: protective immunity to enteric diseases caused by nontyphoidal salmonellae and shigellae may be conferred by serum IgG antibodies to the O-specific polysaccharide of their lipopolysaccharides. *Clin. Infect. Dis.* 15, 346–361.
2. Svenson, S.B. and Lindberg, A.A. (1981). Artificial *Salmonella* vaccines: *Salmonella typhimurium* O-antigen-specific oligosaccharide-protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. *Infect. Immun.* 32, 490–496.

3. Svenson, S.B., Nurminen, M., and Lindberg, A.A. (1979). Artificial *Salmonella* vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 25, 863–872.
4. Konadu, E.Y., Lin, F.Y., Ho, V.A., Thuy, N.T., Van Bay, P., Thanh, T.C., Khiem, H.B., Trach, D.D., Karpas, A.B., Li, J., et al. (2000). Phase 1 and phase 2 studies of *Salmonella enterica* serovar paratyphi A O-specific polysaccharide-tetanustoxoid conjugates in adults, teenagers, and 2- to 4-year-old children in Vietnam. *Infect. Immun.* 68, 1529–1534.
5. Levine, M.M., Kotloff K.L., Barry, E.M., Pasetti, M.F., and Sztein, M.B. (2007). Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 540–553.
6. Ahmed, A., Li, J., Shiloach, Y., Robbins, J.B., and Szu, S.C. (2006). Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2–5-year-old children. *J. Infect. Dis.* 193, 515–521.
7. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler RL, Wolfrom ML, editors. *Methods in Carbohydrate chemistry*. New York Academic Press Inc.; 1965(5):83–91

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kompleksów immunologicznych lipopolisacharyd bakteryjny (LPS)/białko, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) izoluje się z bakterii LPS dowolną metodą, następnie przeprowadza w formę dobrze rozpuszczalną w DMSO poprzez usuwanie kationów metali związanych z LPS oraz ich wymianę na protony, przeprowadzając lipopolisacharyd bakteryjny w formę kwaśną;
 - b) uzyskuje się białko dobrze rozpuszczalne w DMSO, przy czym wszystkie jonowo związane kationy zostają zamienione na protony;
 - c) rozpuszcza się LPS i białko w DMSO i miesza ze sobą oba roztwory uzyskując mieszaninę LPS białko w DMSO w określonym stosunku wagowym; po czym
 - d) stopniowo rozcieńcza się i usuwa DMSO, przy czym nie doprowadza się do degradacji i modyfikacji chemicznej LPS, zachowując kompletną cząsteczkę LPS i jej właściwości antygenowe, a sprzęganie LPS z białkiem następuje w sposób niekowalencyjny.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że LPS pochodzi z dowolnego szczepu bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia*, *Hafnia*, *Salmonella* i *Campylobacter*.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że zastosowane w kompleksie białko może być dowolnym białkiem o właściwościach immunogennych, rozpuszczalnym w DMSO.
4. Sposób według zastrz. 3 **znamienny tym**, że zastosowane w kompleksie białko jest kazeiną lub albuminą surowicy bydlęcej.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że DMSO rozcieńcza się wodą.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że DMSO usuwa się za pomocą dializy, ultrafiltracji lub filtracji żelowej.
7. Kompleks lipopolisacharyd/białko wytworzony sposobem według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 6 do zastosowania do indukcji odpowiedzi immunologicznej.
8. Kompleks lipopolisacharyd/białko według zastrz. 7 do zastosowania przy wytwarzaniu immunogenu lub przeciwbakteryjnej szczepionki weterynaryjnej.
9. Sposób wytwarzania szczepionki weterynaryjnej zawierającej kompleks immunologiczny LPS/białko obejmujący następujące etapy: hodzi się komórki bakteryjne i izoluje się LPS, **znamienny tym**, że przeprowadza się LPS w formę rozpuszczalną w DMSO poprzez usuwanie kationów metali związanych z LPS i ich wymianę na protony, uzyskuje się białko rozpuszczalne w DMSO, w którym wszystkie jonowo związane kationy zostają zamienione na protony, przy czym rozpuszcza się LPS i białko w DMSO a następnie miesza otrzymane roztwory do wytworzenia niekowalencyjnego kompleksu wykazującego immunogenność, przy czym rozcieńczalnikiem zastosowanym do usunięcia DMSO z preparatu jest woda.
10. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że LPS izoluje się metodą ekstrakcji fenol – woda.

11. Sposób według zastrz. 9 **znamienny tym**, że DMSO usuwa się w procesie dializy, ultrafiltracji lub filtracji żelowej.
12. Sposób według zastrz. 9 **znamienny tym**, że uzyskany preparat poddaje się liofilizacji lub formuluje z dowolnym adiuwantem.
13. Szczepionka weterynaryjna zawierająca kompleks wytworzony sposobem według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 6.
14. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że jest w postaci zliofilizowanej.
15. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że jest w postaci formułacji z adiuwantem olejowym takim jak niekompletny adiuwant Freund.
16. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że białko nośnikowe kompleksu stanowi marker pozwalający na śledzenie postępu immunizacji u osobnika.
17. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że wykazuje szerokie spektrum działania wobec wszystkich wersji LPS (serotypów) spotykanych w szczepach *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Hafnia alvei*.
18. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że pobudza swoistą odpowiedź humoralną u osobnika powodując wzrost przeciwciał anty LPS klasy IgG.
19. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że osobnikami immunizowanymi mogą być ptaki i ssaki, takie jak kury i świni.
20. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że immunizacja następuje przez podanie domięśniowo lub dootrzewnowo.
21. Szczepionka według któregośkolwiek z poprzednich zastrz. 13 do 20, **znamienna tym**, że nie wywołuje efektów toksycznych u szczepionych zwierząt.
22. Szczepionka według zastrz. 13 **znamienna tym**, że zawiera kompleks LPS z białkiem w PBS i opcjonalnie dowolny inny adiuwant.

Rysunki

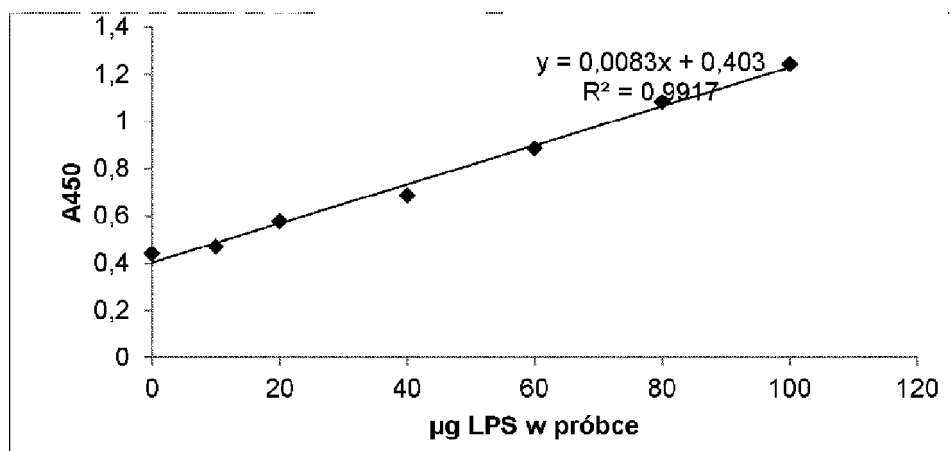


Fig. 1

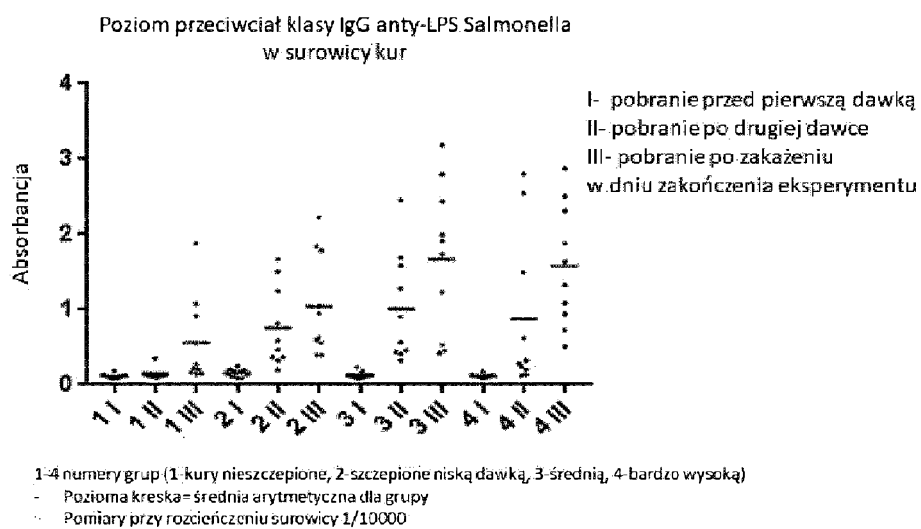


Fig. 2

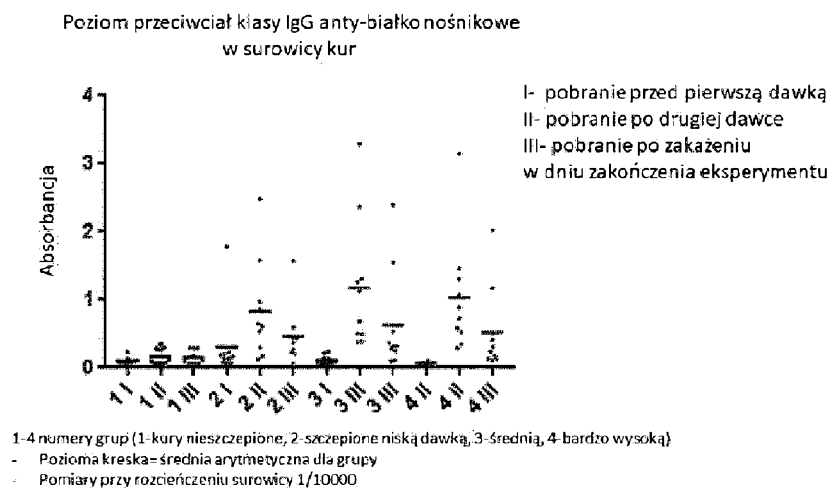


Fig. 3