

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(19)
 ČESKÁ
 REPUBLIKA



ÚŘAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-753**
 (22) Přihlášeno: **26.10.2015**
 (40) Zveřejněno: **31.05.2017**
(Věstník č. 22/2017)
 (47) Uděleno: **25.05.2022**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **06.07.2022**
(Věstník č. 27/2022)

(56) Relevantní dokumenty:

M. Matulova, et al: SPI1 defective mutants of Salmonella enterica induce cross-protective immunity in chickens against challenge with serovars Typhimurium and Enteritidis 2013 Vaccine 31, 3156–3162; M. Matulova, et al: Vaccination of chickens with Salmonella Pathogenicity Island (SPI) 1 and SPI2 defective mutants of Salmonella enterica serovar Enteritidis 2012, Vaccine 30, 2090-2097; Matulová M. et al: Characterization of Chicken Spleen Transcriptome after Infection with Salmonella enterica Serovar Enteritidis 2012 PLoS ONE 7, 10; Matulová M. et al: Chicken innate immune response to oral infection with Salmonella enterica serovar Enteritidis 2013, Vet Res. 44(1): 37, 20.5.2013; Elsheimer-Matulova M. et al: phoP, SPI1, SPI2 and aroA mutants of Salmonella Enteritidis induce a different immune response in chickens 2015 Veterinary Research 46:96, 17.9.2015.

(73) Majitel patentů:

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.,
 Brno Medlánky, CZ

(72) Původce:

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., Rousínov, CZ
 MVDr. Jiří Volf, Ph.D., Brno, CZ
 Mgr. Alena Šebková, Brno, CZ
 Ing. Hana Havlíčková, Brno, CZ
 Mgr. Marta Elsheimer-Matulová, Sobůlky, CZ
 Mgr. Karolína Varmužová, Svatobořice, CZ
 MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D., Rousínov, CZ
 MVDr. František Šišák, CSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

**Způsob stanovení imunitní odpovědi
 drůbeže po vakcinaci živou oslabenou
 vakcínou**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje způsob stanovení imunitní odpovědi drůbeže, zejména kuřat, po orální vakcinaci živou oslabenou salmonelovou vakcínou, a po intravenózní re-infekci plně virulentním kmenem *Salmonella enterica*, spočívající v tom, že se ve vzorku odebraném ze slepého střeva re-infikované drůbeže *in vitro* stanoví exprese alespoň jednoho imunologicky relevantního genu, přičemž vyšší exprese znamená nižší imunitní odpověď, chráněnost a tedy i imunogenitu testované vakcíny.

Způsob stanovení imunitní odpovědi drůbeže po vakcinaci živou oslabenou vakcínou

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká oblasti imunologie, konkrétněji způsobu stanovení imunitní odpovědi drůbeže po vakcinaci živou oslabenou vakcínou, vhodného pro stanovení chráněnosti drůbeže po vakcinaci.

10

Dosavadní stav techniky

Testování chráněnosti drůbeže po vakcinaci oslabenými kmeny *Salmonella enterica* se nejčastěji provádí re-infekcí (čelenží) plně virulentním kmenem *Salmonella enterica*. V takovémto testu jsou nejčastěji orálně vakcinována jednodenní kuřata, která jsou orálně čelenžována 6 týdnů po vakcinaci, tedy ve věku 42 dnů. Kuřata v takovýchto pokusech jsou obvykle utrácena 4 až 14 dnů po čelenži a ve slepém střevě jsou kultivačně stanovovány počty salmonel. V tomto věku jsou však i kontrolní nevakcinovaná kuřata relativně odolná před infekcí virulentními kmeny salmonel (1 až 4), a k průkazu statistické významnosti mezi počty salmonel u nevakcinovaných a vakcinovaných kuřat jsou zapotřebí skupiny kuřat o velkých počtech. K rozlišení vakcinovaných a nevakcinovaných kuřat výrazně nepřispělo ani zavedení metod sledujících expresi vybraných cytokinů ve střevním traktu (nejčastěji slepém střevě) (5, 6).

Alternativně se původci vynálezu pokoušeli o rozlišení chráněnosti vakcinovaných a nevakcinovaných kuřat s využitím intravenózní aplikace plně virulentního kmene *Salmonella enterica*. 4 a 14 dní po čelenži pak stanovovali počty salmonel a expresi vybraných cytokinů ve slezině a játrech kuřat. Podobně jako po orální čelenži a stanovení počtu salmonel ve střevě, ani po intravenózní aplikaci virulentních kmenů nebyly pozorovány signifikantní a reprodukovatelné rozdílné počty salmonel v interních orgánech (4 až 6).

30

Je tedy zřejmé, že v současnosti neexistuje způsob stanovení imunitní odpovědi drůbeže po vakcinaci živou oslabenou vakcínou, který by byl ekonomický a spolehlivý.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob stanovení imunitní odpovědi drůbeže, zejména kuřat, po orální vakcinaci živou oslabenou salmonelovou vakcínou, a po intravenózní re-infekci plně virulentním kmenem *Salmonella enterica*, jehož podstata spočívá v tom, že se ve vzorku odebraném ze slepého střeva re-infikované drůbeže *in vitro* stanoví exprese alespoň jednoho imunologicky relevantního genu, přičemž vyšší exprese znamená nižší imunitní odpověď, chráněnost a tedy i imunogenitu testované vakcíny.

Hodnotu exprese lze srovnávat, např. s výsledky pro nevakcinovanou drůbež, tím lze zjistit, zda je vakcína imunogenní či zda byla vakcinace úspěšná či zda konkrétní kus drůbeže byl vakcinován, případně lze porovnávat hodnoty exprese mezi skupinami drůbeže vakcinovanými různými vakcínami, a tedy porovnávat imunogenitu jednotlivých vakcín.

Imunologicky relevantní geny jsou s výhodou vybrané ze skupiny sestávající z mmp7, lyg2, iNOS a IL22, výhodněji se stanoví exprese všech těchto čtyř genů. V jiném provedení vynálezu jsou imunologicky relevantní geny vybrány ze skupiny sestávající z mmp7, lyg2, iNOS, IL-22, IL4I1, IRG1, SAA, Ex-FABP, es1, AVD, ifit5 a TRAP6, s výhodou se stanoví exprese všech těchto dvanácti genů. V dalším provedení vynálezu jsou imunologicky relevantní geny vybrány ze skupiny sestávající z genů kódujících cytokiny a genů kódujících proteiny akutní fáze infekce, například IL1, IL8, IL17, LITAF, OGCHI a další.

55

S výhodou se při stanovení exprese imunologicky relevantních genů stanoví také exprese normalizačních genů, tj. genů, které mají stálou hodnotu exprese bez ohledu na vakcinaci. Takovými geny mohou být například geny GAPDH, TBP a UB.

5

V rámci předkládaného vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že když se po orální vakcinaci živou oslabenou vakcínou a po intravenózní aplikaci čelenžního plně virulentního kmene stanoví exprese imunologicky relevantních genů ve vzorku slepého střeva odebraném z čelenžované drůbeže, jednoznačně a spolehlivě se odliší vakcinovaní jedinci od jedinců nevakcinovaných. Například u imunologicky relevantních genů vybraných ze skupiny sestávající z mmp7, lyg2, iNOS, IL-22, IL4I1, IRG1, SAA, Ex-FABP, es1, AVD, ifit5 a TRAP6 dochází k více než desetinásobně vyšší expresi ve slepém střevě nevakcinovaných kuřat ve srovnání s vakcinovanými kuřaty.

10

15

Stanovení imunitní odpovědi drůbeže, zejména kuřat, po orální vakcinaci živou oslabenou vakcínou, je vhodné například pro použití pro stanovení chráněnosti drůbeže po vakcinaci.

20

Způsob podle předkládaného vynálezu lze také využít pro selekci nejvhodnějších vakcinačních kmenů stimulujících nejvyšší chráněnost drůbeže, pro stanovení vlivu složení vakcíny na dobu trvání chráněnosti, tím že intravenózní čelenž se provede v různé době po poslední vakcinaci, a/nebo pro stanovení účinnosti vakcinace hejna tím, že se náhodně vybere několik, například 20, kusů drůbeže, u které se provede intravenózní čelenž a stanovení exprese vybraných genů. Podíl silně reagujících kusů drůbeže umožní odhadnout účinnost vakcinace celého hejna.

25

Objasnění výkresů

30

Obr. 1. Podíl průměrné exprese sledovaných genů ve slepém střevě 12 nevakcinovaných a 12 vakcinovaných kuřat 4 dny po intravenózní čelenži. Kuřata bez předchozí vakcinace reagují na intravenózní čelenž signifikantně vyšší expresí sledovaných genů než kuřata po vakcinaci.

Příklady uskutečnění vynálezu

35

Kuřata (12 kusů ve skupině) byla orálně vakcinována první den života živou oslabenou vakcínou obsahující kmen *Salmonella* Enteritidis s delecí ostrova patogenity SPI1 (SPI1 mutant). Vakcinační dávka (0,1 ml) obsahovala 10^7 CFU oslabeného kmene *Salmonella* Enteritidis. Po třech týdnech, tedy ve věku 21 dní, byla kuřata revakcinována stejnou vakcínou a ve stejné dávce. Za další 3 týdny, tedy ve věku 42 dní, byla kuřata intravenózně re-infikována (čelenžována) plně virulentním kmenem *Salmonella* Enteritidis v dávce 10^7 CFU. Kuřata byla utracena 4 a 14 dní po infekci a při pitvě byly odebrány vzorky tkáně slepého střeva. Další kontrolní skupiny po 12 kusech drůbeže se sestávaly z nevakcinovaných a neinfikovaných jako negativní kontroly, a nevakcinovaných a infikovaných jako pozitivní kontroly. Poslední skupina byla vakcinována, jak je popsáno výše, ale re-infekce byla provedena orálně.

45

50

Ze tkáně slepého střeva byla izolována mRNA pomocí RNeasy kitu (Qiagen), která byla ihned přepsána do cDNA s využitím oligodT primerů a M-MLV reverzní transkriptázy. cDNA byla následně využita jako templát v real time PCR s využitím genově specifických primerů a HotStart PCR Master Mix (Qiagen). Expese 3 genů (GAPDH, TBP a UB) sloužila jako referenční pro normalizaci vzorků na stejný obsah mRNA/cDNA. Hodnoty Ct pro každý gen byly odečteny od průměrné Ct hodnot 3 referenčních genů (ΔCt) a expese každého genu byla vypočtena jako $2^{-\Delta Ct}$. Na závěr byl vypočten podíl mezi expresí genů v tkáních pocházejících od nevakcinovaných a vakcinovaných kuřat (obr. 1).

55

Použitá literatura

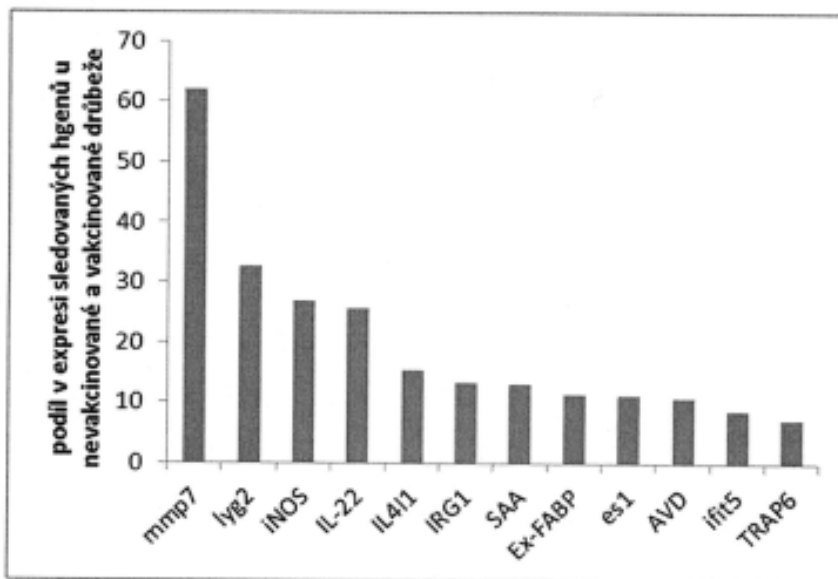
1. Withanage GS, Kaiser P, Wigley P, Powers C, Mastroeni P, Brooks H, Barrow P, Smith A, Maskell D, McConnell I: Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 2004,72:2152–2159.
5
2. Beal RK, Wigley P, Powers C, Hulme SD, Barrow PA, Smith AL: Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re–challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 2004, 100:151–164.
10
3. Beal RK, Powers C, Wigley P, Barrow PA, Kaiser P, Smith AL: A strong antigen–specific T–cell response is associated with age and genetically dependent resistance to avian enteric salmonellosis. *Infect Immun* 2005, 73:7509–7516.
15
4. Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I. Vaccination of chickens with SPI1–lon and SPI1–lon–fliC mutant of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *PLoS One* 2013, 8:e66172.
5. Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I. Vaccination of chickens with *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 and SPI2 defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine* 2012, 30:2090–7.
20
6. Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Babak V, Rychlik I. SPI1 defective mutants of *Salmonella enterica* induce cross–protective immunity in chickens against challenge with serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine* 2013,31:3156–62.
25

PATENTOVÉ NÁROKY

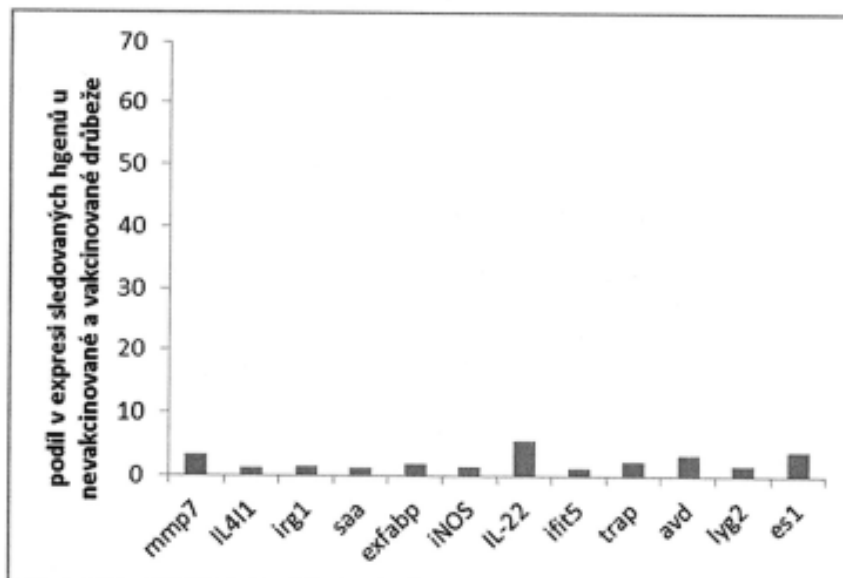
- 5 1. Způsob stanovení imunitní odpovědi drůbeže, zejména kuřat, **vyznačený tím**, že se po orální vakcinaci živou oslabenou salmonelovou vakcínou, a po intravenózní re–infekci plně virulentním kmenem *Salmonella enterica* , ve vzorku odebraném ze slepého střeva re–infikované drůbeže *in vitro* stanoví exprese alespoň jednoho imunologicky relevantního genu vybraného ze skupiny sestávající z mmp7, lyg2, iNOS, IL–22, IL4I1, IRG1, SAA, Ex–FABP, es1, AVD, ifit5, TRAP6, přičemž vyšší exprese znamená nižší imunitní odpověď, chráněnost a tedy i imunogenitu testované vakcíny.
- 10 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že imunologicky relevantní geny jsou vybrané ze skupiny sestávající z mmp7, lyg2, iNOS a IL22, s výhodou se stanoví exprese všech těchto čtyř genů.
- 15 3. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že se při stanovení exprese imunologicky relevantních genů stanoví také exprese normalizačních genů, s výhodou vybraných ze skupiny zahrnující GAPDH, TBP a UB.

1 výkres

A



B



Obr. 1