

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-510145

(P2008-510145A)

(43) 公表日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	F
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2007-525772 (P2007-525772)	(71) 出願人	501458933
(86) (22) 出願日	平成17年8月10日 (2005.8.10)		ベーリンガー インゲルヘイム ヴェトメ
(85) 翻訳文提出日	平成19年4月4日 (2007.4.4)		ディカ アイエヌシー.
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/028464		アメリカ合衆国 64502 ミズーリ州
(87) 国際公開番号	W02006/020730		エステイー. ジョゼフ エヌ. ベル
(87) 国際公開日	平成18年2月23日 (2006.2.23)		ト ハイウエイ 2621
(31) 優先権主張番号	10/918,006	(74) 代理人	100080159
(32) 優先日	平成16年8月13日 (2004.8.13)		弁理士 渡辺 望穂
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100090217
			弁理士 三和 晴子
		(72) 発明者	クロル ジェレミー ジェイ.
			アメリカ合衆国 50323 アイオワ州
			アーバンデール メープル ドライブ
			14216

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 回腸炎診断アッセイ法

(57) 【要約】

動物由来試料中の低濃度の抗ローソニア抗体の、迅速で、容易な検出を可能にする、ローソニア・イントラセルラリス (*Lawsonia intracellularis*) に対する抗体の防御のための、改良されたイムノアッセイ法が提供される。好ましいアッセイ法は、*L. イントラセルラリス* のリポ多糖の抗原性抽出物を使用する、ELISAアッセイ法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物由来試料中のローソニア・イントラセルラリスに対する抗体の存在を検出するためのイムノアッセイ法であり、該試料がローソニア・イントラセルラリスのリポ多糖の少なくとも一部を含む有効量の抗原と接触すること、該抗体と該抗原との間で複合体形成が引き起こされること、及び、該複合体の存在を検出すること、の各ステップを含むイムノアッセイ法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該試料が、動物由来の血清、初乳、関節液、唾液、組織ホモジェネートおよび糞便からなる群より選ばれるイムノアッセイ法。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該動物が、ブタ、ハムスター、青ギツネ、エミュー、シシカ、イヌ、モルモット、ウマ、アカゲザル、ダチョウ、ウサギおよびラットからなる群より選ばれるイムノアッセイ法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗体が、I g G、I g A、および I g M 抗体からなる群より選ばれるイムノアッセイ法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該イムノアッセイ法が E L I S A テストであるイムノアッセイ法。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗原が組換え由来であるイムノアッセイ法。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のイムノアッセイ法であって、該 E L I S A テストが、表面に該抗原を固定すること、該組織が該固定抗原に接触すること、抗体と該抗原の複合体形成が起こることおよび該複合体を検出することの各ステップを含むイムノアッセイ法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該リポ多糖が約 1 5 ~ 2 5 k D a の分子量であるイムノアッセイ法。

30

【請求項 9】

請求項 8 に記載のイムノアッセイ法であって、該分子量が約 1 8 ~ 2 0 k D a であるイムノアッセイ法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗原が、該動物に有効量の抗原が投与された際に、その動物に免疫応答を誘導することができるイムノアッセイ法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗原が、細菌エンドトキシン試験に供した際に約 3 - 7 5 E U / m l の内毒性を示すイムノアッセイ法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のイムノアッセイ法であって、該内毒性が約 2 5 - 4 0 E U / m l であるイムノアッセイ法。

40

【請求項 13】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗原が A T C C アクセション番号 P T A - 4 9 2 7 株のリポ多糖抽出物を含むイムノアッセイ法。

【請求項 14】

ローソニア・イントラセルラリスに対する抗体の存在を検出するための抗原であり、該抗原が、単離されたローソニア・イントラセルラリスのリポ多糖の少なくとも一部を含む抗原。

【請求項 15】

50

請求項 14 に記載の抗原であって、該リポ多糖が約 15 - 25 kDa の分子量である抗原。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の抗原であって、該分子量が約 18 - 20 kDa である抗原。

【請求項 17】

請求項 15 に記載の抗原であって、該抗原が、該動物に有効量の投与をされた際にその動物に免疫応答を誘導することができる抗原。

【請求項 18】

請求項 15 に記載の抗原であって、該抗原が、細菌エンドトキシン試験で約 3 - 75 EU/ml の内毒性を示す抗原。

10

【請求項 19】

請求項 15 に記載の抗原であって、該リポ多糖が組換え由来である抗原。

【請求項 20】

請求項 18 に記載の抗原であって、該内毒性が約 25 - 40 EU/ml である抗原。

【請求項 21】

請求項 14 に記載の抗原であって、該抗原が ATCC アクセション番号 PTA - 4927 株のリポ多糖抽出物を含む抗原。

【請求項 22】

動物由来試料中のローソニア・イントラセルラリスに対する抗体の存在を検出するための酵素結合免疫測定法において、ローソニア・イントラセルラリスのリポ多糖を該イムノアッセイ法において抗原として利用することを特徴とするイムノアッセイ法。

20

【請求項 23】

請求項 22 に記載のイムノアッセイ法であって、該試料が動物由来の血清、初乳、関節液、唾液、組織ホモジェネート、および糞便からなる群より選ばれるイムノアッセイ法。

【請求項 24】

請求項 22 に記載のイムノアッセイ法であって、該動物がブタ、ハムスター、青ギツネ、エミュー、シカ、イヌ、モルモット、ウマ、アカゲザル、ダチョウ、ウサギ、およびラットからなる群より選ばれるイムノアッセイ法。

【請求項 25】

請求項 22 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗体が IgG、IgA および IgM 抗体からなる群より選ばれるイムノアッセイ法。

30

【請求項 26】

請求項 22 に記載のイムノアッセイ法であって、該 ELISA テストが間接 ELISA テストであるイムノアッセイ法。

【請求項 27】

請求項 26 に記載のイムノアッセイ法であって、該 ELISA テストが、該抗原を表面に固定すること、該試料が該固定抗原に接触すること、該試料中の抗体と該抗原との間で複合体形成が引き起こされること、および該複合体を検出することの各ステップを含むイムノアッセイ法。

【請求項 28】

請求項 22 に記載のイムノアッセイ法であって、該リポ多糖が分子量約 15 - 25 kDa であるイムノアッセイ法。

40

【請求項 29】

請求項 28 に記載のイムノアッセイ法であって、該分子量が約 18 - 20 kDa であるイムノアッセイ法。

【請求項 30】

請求項 22 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗原が該動物においてその抗原の有効量が投与された際に免疫応答を引き起こすことができるイムノアッセイ法。

【請求項 31】

請求項 22 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗原が細菌エンドトキシン試験にお

50

いて約 3 - 75 EU/ml の内毒性を示すイムノアッセイ法。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 に記載のイムノアッセイ法であって、該内毒性が約 25 - 40 EU/ml であるイムノアッセイ法。

【請求項 3 3】

請求項 2 2 に記載のイムノアッセイ法であって、該抗原が ATCC アクセション番号 PTA - 4927 株のリポ多糖抽出物を含むイムノアッセイ法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、ローソニア・イントラセルラリスに対する抗体を検出するための、L・イントラセルラリスのリポ多糖抽出物を含み、かつ、好ましくは本質的にそれらからなる、有効な抗原と同程度の、改良されたイムノアッセイに関する。さらに詳しくは、好ましいアッセイ法は、優れた特異性と感度をもち、病気の臨床症状が出現する前の感染初期段階における動物由来組織中の低レベル抗体を検出することができる、間接 ELISA 法である。

【背景技術】

【0002】

ブタ増殖性腸炎 (PPE) は回腸炎、腸腺腫症、出血性腸炎、または壊死性腸炎としても知られ、離乳子畜期から若い成体期のブタに被害を及ぼす自然発生病である。PPE は、かつてはカンピロバクター様の微生物あるいは回腸細胞内寄生虫により引き起こされると考えられていた。より近年では、病原体が、細胞内絶対寄生性のグラム陰性細菌、ローソニア・イントラセルラリスであることが明らかになってきている。この疾患は、罹患した動物での、死亡損耗、投薬コスト増大、体重増加不良、および食料変換の減少のため、経済的に重要である。

【0003】

PPE の合理的な治療法と効果的な制御において、主たる要素は迅速かつ正確な病原体の同定である。PPE は肉眼的病変を観察することによって診断でき、抗ローソニアモノクローナル抗体を用いた特殊な染色法によって細胞内の曲がった桿菌が示される、特異な組織病理学的病変を観察することによって確定できる。理想的には、最終判断が病原体の分離中にされるべきである。しかしながら、L・イントラセルラリスの分離と培養は特殊な細胞培養技術を必要とする。

【0004】

過去においては、抗ローソニア抗体の検出に関して迅速アッセイ法開発のための試みられてきた。間接蛍光抗体法 (IFAT) および免疫ペルオキシダーゼ法 (IPMA) のような、現在の血清学的アッセイ法は、生体ブタ血清中の抗ローソニア抗体検出において、よい感度とよい特異性を示している。クニッテル JP、ジョーダン DM、シュワルツ KJ ら、ローソニア・イントラセルラリス曝露ブタを検出するための、死亡前のポリメラーゼ連鎖反応と血清学的方法の評価、*American Journal of Veterinary Research* 59:722 - 726 (1998)、ガイズ RMC、ゲプハルト CJ、ディーン J ら、ブタ増殖性腸炎の血清学的試験法としてのイムノペルオキシダーゼ単層アッセイの検証、*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14:528 - 530 (2002)、それらの教示と内容は、本明細書に、参照により取り入れられている。しかしながら、これらのアッセイ法はどちらも、感染初期や発病間もない頃のブタの血清によくみられる低濃度の抗ローソニア抗体を検出するには感度が十分ではない。さらに加えれば、これらの既存のアッセイ法は、正確に検査を行い、結果を解釈するために、高度の技術をもつテクニシャンに依存している。例えば、顕微鏡を覗くことに何時間も費やすこと、UV あるいは自然光に照らされたウェルを分析すること、および“陽性の”試料を示す蛍光グリーンやレッドに染色された L・イントラセルラリスまたは L・イントラセル

10

20

30

40

50

ラリス感染細胞を探すことによって結果が主観的に得られる。

【0005】

酵素結合免疫測定法 (ELISA) もまた、抗ローソニア抗体を検出するために開発が行われてきた。これらのこれまでの尽力は、抗原の質量ともに悪いこと、抗体価のばらつき、適正な“カットオフ”値が無いために感染および非感染動物間での抗体価がオーバーラップすること、及びブタ抗体の非特異的抗原要素に対する交叉反応のせいで、十分に高感度で高特異性なアッセイ法を生み出せなかった。ホリオウク PK、カトラー RS、カプル IW、モンクトン R.P.、ブタにおける、回腸共生イントラセルラリス特異的免疫的免疫グロブリン G の血清中での反応を測定するための、酵素結合免疫吸着アッセイ、*Journal of Clinical Microbiology* 31:1980-1985 (1994)、これの教示と内容は、本明細書に、参照により取り入れられている。

10

【0006】

従って、高感度かつ高特異性で、感染初期段階で動物由来組織中の低濃度の抗体の正確な検出ができる、改良された抗ローソニア抗体アッセイの技術に対する需要がある。

【0007】

リポ多糖 (LPS) は、細菌の構造維持に大きく貢献し、宿主免疫防御からそれらを守る、L. イントラセルラリスのようなグラム陰性細菌の主要な高次構造体である。LPS はグラム陰性細菌の細胞壁の一部を構成し、3つの部分：糖側鎖、コア多糖、およびリピド A、からなる。リピド A は一般的でない脂肪酸 (例えば、ヒドロキシミステリン酸) を含み、一方では、コア多糖は一般的でない糖 (例えば、KDO、ケトデオキシオクツロン酸およびヘプツロース) をしばしば含む。糖側鎖は細菌の O 抗原に関係する。LPS は、マクロファージの CD14 レセプターに結合でき、マクロファージ/内皮細胞の全カスケードのトリガをひいて炎症サイトカインを分泌するため、エンドトキシンとして機能する。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、上述の諸問題を解決し、ローソニア・イントラセルラリスに対する抗体の存在を、PPE の早期検出のために利用できる、高度の特異性と感度で検出するための改良されたイムノアッセイ法を提供する。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

大枠でいうと、本発明のアッセイは、動物由来試料が、L. イントラセルラリスのリポ多糖の少なくとも一部を含む有効量の抗原と接触し、抗原と抗体の複合体形成を引き起こし、その後、そのような抗原-抗体複合体を検出するイムノアッセイである。好ましい態様では、このアッセイ法は間接 ELISA テストである。

【0010】

動物由来試料は、もっとも好ましくは血清であるが、初乳、関節液、唾液、組織ホモジネート又は糞便を含んでもよい。これらの試料はアッセイ目的のための通常の技術に基づいて調製することができる。本発明は特にブタの PPE 検出に関するものであるが、類似のローソニアに起因する疾患についても、ブタ、ハムスター、青ギツネ、エミュー、シカ、イヌ、モルモット、ウマ、アカゲザル、ダチョウ、ウサギ、又はラットにおいて検出可能である。本発明の方法を使って検出される抗体は、一般に IgG、IgA 及び IgM よりなる群から選ばれる。

40

【0011】

本発明のイムノアッセイで使うための好ましい抗原は、L. イントラセルラリスのリポ多糖の一部又は抽出物である。この抽出物は、好ましくは、分子量約 15 - 25 kDa であり、より好ましくは、約 18 - 20 kDa である。抽出物又はその一部は必要な分子量を有しており、かつ、有効量の抗原が投与された時に、動物に免疫応答を誘導する抗原性

50

を有すべきである。さらには、抽出物又はその一部は、LPS抗体とともに抗体-抗原複合体を形成するための十分な大きさを有さねばならない。特に好ましい形態では、細菌エンドトキシン試験において、LPS抗原が約3-75 EU/ml(より好ましくは、約10-60 EU/ml、より一層好ましくは約20-50 EU/ml、さらにより一層好ましくは約25-40 EU/ml)の内毒性を示す。抗原は、好ましくはLPS抽出物のみから成り、L・イントラセルラリス ATCCアクセッション番号PTA-4927株の抽出物で良い結果が得られている。

【0012】

本出願では、ELISA法に限らず、競合又は阻害アッセイを含み、また、直接および間接のアッセイ法、同様にサンドイッチ法又はキャプチャー法を含む様々なタイプのイムノアッセイ法が利用できることが判明している。もっとも好ましいイムノアッセイ法は、最初にマイクロタイタープレートのウェルをLPSでコーティングし、続いて室温で一晩インキュベートする手順を含む、間接ELISA法である。ブロッキング試薬がそのあとに加えられ、さらに一晩4でインキュベートされる。選ばれた希薄な検出抗体がそのあとに加えられ、37で1時間インキュベートされ、次に、希薄な酵素標識抗体が加えられ、さらに1時間、37でインキュベートされる。次に、TMB色素が加えられ、室温で5分間インキュベートされる。この時点で2M硫酸を加えることによって反応が停止させられ、波長450nmでプレートが読まれる。

10

【0013】

好ましいELISAテストは、約34.75 EU/mlのエンドトキシンレベルをもつATCCアクセッション番号PTA-4927の、開始LPS抽出物試料の場合に最適化されている。そのような例の場合には、抗原が約1:250から1:8000の希釈率で存在すべきであり、より好ましくは約1:400から1:6000であり、より一層好ましくは約1:500から1:4000であり、さらにより一層好ましくは約1:600から1:3000であり、より一層好ましくは1:750から1:2000であり、さらにより好ましくは約1:900から1:1500であり、最適は1:1000である。検出抗体は約1:20-1:320、1:25-1:240、1:30-1:128、1:35-1:60の希釈レベルで存在すべきであり、最適は1:40である。ELISAコンジュゲートは、約1:250-1:2000、1:300-1:1500、1:350-1:1000、1:400-1:600のレベルで存在すべきであり、最適は1:5

20

30

【0014】

本発明は組換えLPS抗原が抗原ソースとして使われる場合にもまた向いている。そのような場合には、LPS抗原又はその一部が通常組換え技術によって作製される。たとえば、LPS抗原又はその適切な部分をコードするDNAが、発現ベクタに組み込まれ、発現ベクタが適切なLPS抗原又はその一部をそれから発現できる、発現コントロール配列に操作可能にリンクされてもよい。発現された抗原はそれから回収され、本発明に従って使用される。もちろん、本技術におけるスキルは、本発明に従って組換え抗原を製造し回収する様々な方法に精通している。全ての例において、組換え抗原は、本発明に従って

40

、L・イントラセルラリス抗体に選択的に結合又はハイブリダイズするだろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

次の実施例はイムノアッセイのための抗原ソースとしてローソニアLPSの作製と使用のための、現時点で望ましい技法を述べるものである。そうした例にはローソニア抗体に対する間接ELISAイムノアッセイが含まれている。しかし、そうした例は説明のための手段としてのみによって提供され、そのことによって本発明の全範囲を制限すると解釈されてはならないと、理解されるべきである。

【実施例1】

【0016】

50

LPSをもとにした間接ELISAアッセイの開発と確立 細菌抗原の準備

細菌分離株は高継代（感染した腸から最初に分離後、20代を超える継代を行った）のL・イントラセルラリス分離株#15540（ATCCアクセッション番号PTA-4927）と決定された。この分離株は急性出血性増殖性腸症（HPE）に罹患したデンマークの雌ブタから得られたものであり、定常的な組織学的及び免疫組織化学的（IHC）染色によって確認され、以前記載された方法によってL・イントラセルラリスの純粋培養を得るために共培養された。ローソン GHK、マクオリスト S、ジャスニラ、ブタ増殖性腸炎の細胞内細菌：イン・ピトロの培養と管理、*Journal of Clinical Microbiology* 31:1136-1142 (1993)、この教示と内容は、本明細書に、参照により取り入れられている。バイオリアクター（アブリコン社、フォスターシティ、CA）の中で新鮮なマッコイ細胞（ATCCアクセッション番号1696）懸濁液を使い、並列30LバッチでL・イントラセルラリス#1540を培養した。活性のある培養では80-100%の細胞感染率に達するまで培養を行い、それから、アバンティ ベックマン J-20I遠心機（ベックマン・インスツルメンツ社、フラトン、CA）、JA-10ローターを用い、17,000×g、15分間、4の条件で遠心分離を行い、集菌を行った。各バッチの上清は廃棄され、細胞外L・イントラセルラリスとL・イントラセルラリスに感染したマッコイ細胞の両方を含む細胞ペレットは30mlの滅菌1×リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に再懸濁され、-80に保存された。

10

20

【0017】

マッコイ細胞からL・イントラセルラリスを精製するため、不連続パーコール密度勾配遠心分離法が、以前に記載の方法を若干変更した方法に従って、準備された。ホリオウク PK、カトラー RS、カブル IW、モンクトン RP、ブタにおける血清中の中腸共生イントラセルラリスに特異的イムノグロブリンGの反応を測定するための酵素結合免疫吸着測定法、*Journal of Clinical Microbiology* 31:1980-1985 (1994)、この教示と内容は、本明細書に、参照により取り入れられている。手短にいえば、225mlのパーコール（アマシャムバイオサイエンス社、ファルマシアバイオテク社、ウプサラ、スウェーデン）を260mlの試薬グレード（RG）純水および15mlの5M食塩水（NaCl、フィッシャーブランド）と混合した。上述の回収された培養物は25ゲージの針を20回超通過させ、細菌/マッコイ細胞ホモジェネートの5mlを25mlの調製済パーコール密度勾配液とあわせ、30ml容ポリカーボネート塩沈管に移した。チューブは転倒混和により混合し、37,000×g、1時間、4の条件で遠心分離を行った。その結果生じる混濁液はチューブの上部50%に分散した細胞破砕片を含み、また同時に浮遊密度1.075g/mlの位置に一本の明瞭な細胞バンドパターンを見ることができた。密度勾配の上半分を取り除き、先のバンドを、5mlポリプロピレンピペットを使って注意深く吸い取り、20mlの滅菌PBSを入れた新しい30ml容量遠沈管に移した。チューブを37,000×g、15分間、4の条件で遠心分離し（アバンティ ベックマン J-201、JA-17ローター）、このプロセスは各試料からパーコールを洗除するために最大3回まで繰返し行った。最後の遠心分離ステップの後、各ペレットをそれぞれ1から2mlの滅菌PBSに再懸濁し、ひとつにまとめ、1.8ml容量クリオバイアルチューブ（ナルゲン社、ナルジェヌクインターナショナル社、ロチェスター、NY）に分注し、-80に保管した。高度に濃縮されたパーコール精製L・イントラセルラリス#15540を含む再懸濁液の試料は、小さな湾曲した桿菌が存在していることと完全なマッコイ細胞が存在していないことを確認するため、暗視野顕微鏡観察が行われた。LPS抗原成分がパーコール精製L・イントラセルラリス#15540抗原から、熱フェノール水により、先に記載の方法をすこし改変して、抽出した。ヴェストファール、O.とルーデリッツ、O.グラム陰性細菌のリポ多糖に関する化学的研究、*Angew. Chemical* 66:407-17 (1954)、この教示と内容は、本明細書に、参照により取り入れられている。手短に

30

40

50

例えば、18 mlのパーコール精製L・イントラセルラリスと3.75 mlのフェノールクロロホルム(アメレスコ社, ソロン, OH), pH 8.0、が別個に65のウォーターストラスで10分間インキュベートされた。最初のインキュベーション時間の後、4.5 mlのパーコール精製L・イントラセルラリスが4.5 mlの90%(v/v)熱フェノール水懸濁クロロホルムを入れた各チューブに移され、穏やかに転倒混和された。チューブはさらなる25分間65ウォーターストラス中で、インキュベーション中を通じて5分ごとに転倒混和しながら、インキュベートされ、4で一晚冷却された。液相と固相のわずかな相分離が各チューブ内で、冷蔵中に、起こった。各チューブは、7,700×gで25分間、4で遠心分離(アバンティ ベックマン J-201, JA-17ローター)され、全4本のチューブからのLPSを含む上清は、まとめられ、保存されたが、一方、細胞ペレットは捨てられた。上清はプレ滅菌された透析チューブ(スペクトラムラボラトリーズ社, ランチョドミンゴ, CA)に移され、4Lのプラスチックビーカー内に設置され、試薬グレード(逆浸透)冷水で24から48時間、試料からフェノールクロロホルムを除去するために透析された。試薬グレード水は新しい水に2から4時間ごとに、洗浄ステップが完了するまで、交換された。結果的に得られた精製L・イントラセルラリスLPS抽出物は注意深く収集され、使用するまで-80に保存された。

10

【0018】

LPS抽出物の確認は、4-12%のビス-トリス プレキャストゲル(NuPAGE, インビトロゲン社, カールスバッド, CA)上で、MOPS泳動緩衝液中のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による、分離によって、目に見えるようにされた。LPS抽出物は、パーコール精製全細胞L・イントラセルラリス及び非感染全細胞マッコイ細胞と比較された。試料は、それぞれ1:2に4×ドデシル硫酸リチウム塩(LDS)変性緩衝液で希釈し、85に10分間インキュベートすることによって、SDS-PAGEに準備された。ゲルは、バイオラッド社銀染色説明書を変更した手順に従った、過ヨウ素酸銀染色であった。要するに、ゲルは、40%メタノール(MeOH, フィッシャーブランド, ハノーバーパーク, IL)/10%酢酸(フィッシャーブランド)(v/v)中で20-30分間、その後、0.7%過ヨウ素酸を含む40%メタノール/10%酢酸中でさらに室温で5分間の第一固定に供された。第二固定は、ゲルを10%エタノール(EtOH)/5%酢酸(v/v)に5分間、続いて、酸化試薬(バイオラッド社, ヘルクレス, CA)中に5分間の酸化、その後、脱イオン水で黄色い色がゲルからなくなるまで洗浄、を含んだ。ゲルは、0.16 mMジチオスレイトール(DTT)を含む水中で5分間インキュベートされ、室温で20分間銀試薬(バイオラッド社)中で染色された。ゲルは脱イオン水中で20-40分間一度洗浄され、現像試薬(バイオラッド社)中に、望むバンドの強さが出るまで置かれた。反応は、5%(v/v)酢酸中に20分間、室温で停止され、脱イオン水で一度洗浄された。タンパク質は、10から220 kDaのタンパク質マーカー(ベンチマーク, インビトロゲン社)を使い、それらの分子量によって同定された。

20

30

【0019】

LPSを基にした間接ELISA

抗ローソニア免疫グロブリンG(IgG)抗体は、L・イントラセルラリスLPSを基にした間接酵素免疫測定法(LPS-ELISA)を使い、検査試料中で検出された。ローソニア・イントラセルラリスLPSが100 μl/ウェルでイムロン2HBプレート(ダイネックス社, チャンティリー, VA)に、pH 9.6の0.05 M炭酸ナトリウムコーティング緩衝液中に1:1000希釈で、コーティングされ、マイラープレートシーラー(サーモラブシステムズ社, フランクリン, MA)でシールされ、さらに、室温で24時間インキュベートされた。それぞれのプレートは、350 ml/ウェル、ソークタイム0秒、1洗浄サイクルの条件で、0.05%ツイーン20(フィッシャーブランド)、0.137 M食塩(フィッシャーブランド)、0.005 M塩化カリウム(KCl, シグマ社, セントルイス, MO)、0.009 Mリン酸水素ナトリウム(Na₂HPO₄, シグマ社)、0.001 Mリン酸二水素カリウム(KH₂PO₄, シグマ社)、pH 7.2か

40

50

ら 7.4、を試薬グレードの水に含む洗浄緩衝液で、ウルトラウオッシュプラス（ダイネックス社）を使い、洗浄された。抗原にコートされたプレートは、300 ml / ウェルで、5% (v/v) 脱脂粉乳（バイオラッド社）、をシーブロックTM（ピアースバイオテック社、ロックフォード、IL、スチールヘッド血清及び0.1%酸化ナトリウムをPBSに含む）に含むブロッキング緩衝液を使い、試験血清のプレートへの非特異的結合を防ぐために、4 で、24時間、ブロッキングされた。その後、各プレートは上に述べたように3サイクル、洗浄された。

【0020】

ウェルあたり50マイクロリットルの血清が、各プレートに2連で移され、シールされ、37 で1時間、インキュベートされた。洗浄ステップは、ヒツジ抗ブタIgGセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲート（キルケガード・アンド・ペリー社、ガイザーズバーグ、MD）をブロッキング緩衝液で1:500希釈したもののうち、50 µl / ウェルを加える前に、3サイクル繰り返された。洗浄ステップはさらに3サイクル繰り返され、その後、2-コンポーネント3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン（TMB, KPL）からなるペルオキシダーゼ基質の50 µl がそれぞれのプレートにアプライされ、室温で5分間インキュベートされた。これは、それぞれの試験試料中に抗原-抗体複合体の存在を観察するために行われた。発色反応は、2M硫酸（H₂SO₄, フィッシャーブランド）のうち50 µl / ウェルを移すことにより停止された。プレートは、V-マックス96ウェルマイクロタイタープレートリーダー（メドテックス社、チャペルヒル、NC）上、波長450 nmで、各サンプルに対する光学濃度（OD）値を測定するために、読まれた。高い陽性から低い陽性までの範囲を含むスタンダードのコントロール（最も高い陽性サンプルのブロッキング緩衝液による2倍希釈系列）及びL-イントラセルラリスLPS抽出物に対する抗体が、それぞれのプレートに含まれた。試験プレートは、決定係数（r²値）がスタンダードのOD値の直線回帰分析において0.9であれば、適正と判断された。試験あるいはコントロール試料を含まない空のウェルは、すべての試験に対して、ブランクコントロールとして利用された。

【0021】

LPS-ELISAの検証

ブタ血清は、ブタでの抗ローソニアIgG抗体の検出のためのLPS-ELISAを検証するときに利用するための、次の研究から得られた。（i）約3週齢の2匹のブタが、フロインドの不完全アジュバンド（シグマ社）で1:2の組成にされた、2 mlのL-イントラセルラリスLPS抽出物の筋肉注射によって過免疫された。約3週齢の一匹のブタが、フロインドの不完全アジュバンドで1:2の組成にされた、5% (w/v) のウシ血清（JRHバイオサイエンス社、レネクサ、KS）含有ダルベッコ最小必須培地（DMEM）からなる2 mlのプラセボの筋肉注射をされた。それぞれの接種のブースターは、陽性（L-イントラセルラリスに対する抗体）と陰性（L-イントラセルラリス抗体なし）の作製のために、接種後3週間と6週間に投与された。4から6ミリリットルの血清が、接種後3週間と6週間に、接種に先立って、それぞれのブタから採取され、血清試料中に抗ローソニア抗体が有るか無いかを確認するため、間接蛍光抗体法による血清学的試験（IFAT）、L-イントラセルラリス全細胞抗原の反応の検査が行われた。これは、クニッテル JP、ジョーダン DM、シュワルツ JKら、ローソニア・イントラセルラリス曝露ブタの検出のための死亡前のポリメラーゼ連鎖反応および血清学的方法の評価、American Journal of Veterinarian Research 59:722-726 (1998) に従い、これの教示および内容は、本明細書に、参照により取り込まれている。接種後8週間目に。動物は殺され、最後の血清採取が得られた。それぞれのブタからの陽性コントロール血清がまとめられ、IFATによりL-イントラセルラリスに対する陽性反応を確認するために検査され、抗ローソニアLPS陽性および陰性のコントロール血清が1 mlに分注され、-80 に保存された。

【0022】

2つの以前実施されたワクチンの効能に関する研究、すなわち、Kroll, J.ら（

2004)、ローソニア・イントラセルラリスの無毒化生ワクチンを経口投与した結果起こる、ブタにおける防御免疫の評価、AJVR 65(5):559-565は、その教示と内容が、本明細書に、参照により取り入れられているが、それからのブタ血清は、抗ローソニアLPS抗体の陽性/陰性のカットオフ限界を調べるために検査された。80匹の6から9週齢の、従前に抗ローソニア抗体に対してIFAT陽性であることが確認されているブタからの試験血清は、病原性の非相補的L・イントラセルラリス分離株N101494(ベーリンガーインゲルヘイム ベトメディカ社, セントジョセフ, MO)の実験的な注射の後に作製された。IFAT陰性であると以前に確認された試験血清は3から9週齢のワクチンまたは攻撃をそれぞれの臨床研究の間を通じて受けたことがない、厳密にコントロールされたブタから採集された。

10

【0023】

175個の血清試料が、L・イントラセルラリスワクチン、Enterisol(登録商標) Ileitis(ベーリンガーインゲルヘイムベトメディカ社)の弱毒化生ワクチン注射の後か、病原性異抗原性L・イントラセルラリス分離株N101494についての抗原投与の後か、両方の後、25匹のブタから採集された。さらなる70個の血清試料が、研究の間ずっとワクチン注射も抗原投与も受けず、抗ローソニア抗体に対するIFAT陰性である、10匹の厳密なコントロールブタから採集された。研究計画は35匹の、ランダムに3つの取り扱いグループに分けられた、3から4週齢のブタを含んだ。研究の0日目には、グループ1からの15匹のブタは2mlのワクチンの経口投与を受け、一方、グループ2及び3(ブタ10匹/グループ)は、非感染のマッコイ細胞培地懸濁液の当量の偽薬を投与された。21日目には、グループ1及び2は、L・イントラセルラリスN101494の感染性異抗原性純粋培養攻撃を胃内投与された。42日目には、ブタは、ワクチン非投与、被攻撃ブタに比べてワクチン投与ブタの効能を見極めるために、検死され、病変の発達について評価された。糞便試料と血清が第0日目から42日目まで、ワクチンあるいは攻撃の投与に従うL・イントラセルラリスの曝露と排出の割合を検出するための、ルーチンの診断検査のために、毎週採集された。病変はPEの存在を確認するために、42日目のみに、下に記載するような組織学的及びIHCの方法による、徹底的な検査によって、検査された。

20

【0024】

ブタにおけるPEの確認

30

上記記載の臨床研究における、ブタの回腸あるいは結腸全般にわたる病変は、粘膜の厚さの重篤さに従ってスコア化された(1=正常、2=軽度の肥厚、3=中程度の肥厚/炎症、4=重度の肥厚/炎症/粘膜出血あるいはネクロシスが認められる)。クロール, J.ら(2004)、ローソニア・イントラセルラリスの無毒化生ワクチンの経口投与の結果起こるブタにおける防御免疫の評価、AJVR 65(5):559-565。長さ2から4cmの、回腸あるいは結腸の試料は死後に採集され、緩衝ホルマリン中に浸漬により固定され、微視的な病変を検出するための処理をされた。これは、ヘマトキシリンとエオシン(H&E)および特異的L・イントラセルラリスモノクローナル抗体に結合するIHC染色を含む。クロール, J.ら、AJVR(2004)。後者はL・イントラセルラリスに実際にブタが感染している状態を評価するための現在の標準と考えられる。クロール, J.ら(2004)。IHC染色組織にみつかった微視的な病変は、L・イントラセルラリスに特異的な細胞伸長の重篤さに従って、別途にスコア化された(0=正常、1=軽度/局所的、2=中程度/広汎、3=重篤/広汎)。平均的な全体的および微視的な病変のスコアと、感染した組織に検出される病変の頻度が、グループ間比較のために算出された。平均的な全体的および巨視的病変のスコアは、従前の研究、クロール, J.ら(2004)、における病原性異抗原性攻撃ワクチンの効果を測定するための第1のパラメータと考えられた。

40

【実施例2】

【0025】

好ましいLPS-ELISAの材料と方法

50

次にあげるものは本発明に対応した、現時点で好ましいL P S - E L I S Aアッセイ法を述べるものである。

【 0 0 2 6 】

A . プロトコール

1 . 材料

- a . L P S 結合プレート :
- ・ イムロン 2 H B 9 6 ウェルプレート、ダイネックス社カタログ番号 3 4 5 5、又は相当品。
- b . 希釈プレート :
- ・ ファルコンプロバインドアッセイプレート (フィシャーサイエンティフィック社, ピッツバーグ, P A), 9 6 ウェル, U 底, リッド無し (ポリスチレン, 未滅菌), ベクトン・デッキンソン社 (サンディエゴ, C A) カタログ番号 3 5 3 9 1 0、又は相当品。
- c . プレートシーラー :
- ・ マイラプレートシーラー, サーモラプシステムズ社 (フランクリン, M A) カタログ番号 5 7 0 1、又は相当品。
- d . コーティング緩衝液 :
- ・ 0 . 0 5 M 炭酸ナトリウム緩衝液。
 - ・ 1 0 . 6 g 炭酸ナトリウム シグマ社カタログ番号 S 6 1 3 9、又は相当品。
 - ・ 1 . 0 L まで水 (試薬級あるいは相当品) で満たす。
 - ・ p H = 9 . 6 ± 0 . 1 に調整する。
 - ・ 使用するまで 2 - 7 に保存する。
 - ・ 使用期限 : 7 日間。
- e . 洗浄液 :
- ・ 0 . 0 5 % ツイーン 2 0, 0 . 1 3 7 M 塩化ナトリウム, 0 . 0 0 5 M 塩化カリウム, 0 . 0 0 9 M リン酸水素二ナトリウム, 0 . 0 0 1 M リン酸二水素カリウム。
 - ・ 3 2 . 0 g 塩化ナトリウム。
 - ・ 0 . 8 g 塩化カリウム。
 - ・ 2 . 4 4 g リン酸水素二ナトリウム。
 - ・ 0 . 8 g リン酸二水素カリウム。
 - ・ 4 . 0 L まで純水 (試薬級または相当品) で満たす。
 - ・ 水酸化ナトリウム又は塩酸を用いて p H を 7 . 2 から 7 . 4 に調整。
 - ・ 2 . 0 m l ツイーン フィッシャー カタログ番号 B P 3 3

- 7 - 100、又は相当品。
- ・ 使用するまで室温 (25 ± 5) に保存する。
 - ・ 使用期限：1週間。
- f . **ブロッキング液：**
- ・ 5%脱脂粉乳を含むシーブロック (商標) 。
 - ・ 25 . 0 g 脱脂粉乳 バイオラッド社カタログ番号 170 - 6404、又は相当品。
 - ・ シーブロック (商標) で 500 ml にする。ピアースバイオテック社カタログ番号 37527、又は相当品。
 - ・ 使用するまで 2 - 7 に保存する。
 - ・ 使用期限：1ヶ月。
- g . **抗原：**
- ・ L . イントラセルラリス由来リポ多糖全分子の 1 : 1000 希釈。
 - ・ 40 µ l の L . イントラセルラリス リポ多糖を 40 ml のコーティング緩衝液に溶かす。
 - ・ 調製後、直ちに使用する。
- h . **検出抗体：**
- ・ 回復期ブタの L . イントラセルラリスに対する血清抗体の 1 : 40 希釈。
 - ・ 3 µ l のブタ血清又は相等品を 120 µ l のブロッキング液に入れる。
 - ・ 使用するまで 2 - 7 に保存。
 - ・ 使用期限：24時間。
- i . **酵素標識抗体：**
- ・ ヤギ抗マウス Ig G (H + L) - ワサビダイコンペルオキシダーゼ (HRP) の 1 : 500 希釈 キエルケガード・アンド・ペリー・ラボラトリーズ社カタログ番号 14 - 14 - 06、又は相当品。
 - ・ 40 µ l 酵素標識抗体を 20 ml のブロッキング液に混合する。
 - ・ 使用するまで 2 - 7 に保存。
 - ・ 使用期限：24時間。
- j . **基質：**
- ・ ツーコンポーネント マイクロウェル ペルオキシダーゼ基質 (ガイザーズバーグ , MD) KPL社カタログ番号 50 - 76 - 00、又は相当品。
 - ・ 等容の TMB ペルオキシダーゼ基質 (試薬 A) とペルオキシダーゼ溶液 B (試薬 B) を、使用

10

20

30

40

50

- する直前に混合する。
- ・ 必要な容量 = プレートあたり 5 ml、である。従って、検査プレート 1 枚につき、試薬 A を 2.5 ml + 試薬 B を 2.5 ml である。
 - ・ 使用するまで 2 - 7 に保存する。
 - ・ 使用期限：プレミックス試薬は製造元の提示する使用期限。混合した基質溶液は直ちに使用する。
- 10
- k . 停止液：
- ・ 2 M 硫酸
 - ・ 換気フード内で注意深く混合する：444.4 ml の試薬グレードの水。
 - ・ 55.6 ml の 18 M 硫酸 フィッシャー社カタログ番号 A300c-212、又は相当品。
 - ・ 使用するまで室温で保存する。
 - ・ 使用期限：6 ヶ月。
- 20
- l . 陽性コントロール
- ・ 1 : 2546 に希釈した、抗ローソニア LPS IgG 抗体を含む過免疫ブタ血清。
 - ・ 3.9 μl の陽性コントロール、ロット番号 090203 を 10 ml のブロッキング溶液に加える。
 - ・ 使用するまで 2 - 7 に保存する。
 - ・ 使用期限：24 時間。
- 30
- m . 陰性コントロール
- ・ 1 : 2546 に希釈した、L . イントラセルラリス LPS 分子に対する抗体を含まない、過免疫ブタ血清。
 - ・ 3.9 μl の陽性コントロール、ロット番号 090203 を 10 ml のブロッキング溶液に加える。
 - ・ 使用するまで 2 - 7 に保存する。
 - ・ 使用期限：24 時間。
- 40

【 0 0 2 7 】

2 . 方法

- a . 試料は二連で検査を行う。必要なプレートの数 = 全試料数 / プレートあたり 40 試料、である。端数は切り上げて全プレート数とする。11 番目と 12 番目の列は、陰性及び陽性のコントロール血清の 1 : 10 希釈系列を入れる。

- b . L . イントラセルラリス L P S 抗原を 1 : 1 0 0 0 あるいは適切な希釈率にコーティング緩衝液で希釈する。必要な容量 = プレーートの数 × プレートあたり 1 0 m l 、である。
- c . 1 0 0 m l の希釈抗原を各プレートの全てのウェルに加える。
- d . プレートシーラーでプレートをシールし、室温で一晩 (1 4 - 2 4 時間) インキュベートする。
- e . プレートを、ダイネックス ウルトラウォッシュプラスを使い、 3 5 0 m l / ウェル、ソークタイム 0 秒、 1 サイクル行う条件で、洗浄緩衝液で洗浄する。プレートをペーパータオルに叩きつけ、乾燥させる。 10
- f . 3 0 0 m l のブロッキング液を全てのウェルに注ぐ。プレートをシールし、 2 - 7 で一晩インキュベートする (1 4 - 2 4 時間) 。
- g . プレートを、ダイネックス ウルトラウォッシュプラスを使い、 3 5 0 μ l / ウェル、ソークタイム 0 秒、 3 サイクル繰り返す条件で、洗浄緩衝液で洗浄する。プレートをペーパータオルに叩きつけ、乾燥させる。 20
- h . U 底希釈プレートの場合には、 1 2 0 μ l のブロッキング液試料を 1 番目から 1 0 番目のウェル列と 1 1 番目と 1 2 番目の列の B から H までのウェル行に加える。
- i . 2 4 0 μ l の陰性および陽性コントロールを 1 1 列目と 1 2 列目の A 行のウェルに、それぞれ加える。
- j . ウェル A - 1 1 と A - 1 2 の希釈コントロール血清のうち 1 2 0 μ l を、 5 0 - 3 0 0 μ l 対応マルチチャンネルピペットを使い、陰性コントロールを、プレートブランクとして使う 1 1 列の最後のウェル (ウェル H - 1 1) に移さぬよう注意しながら、ウェル B - 1 1 と B - 1 2 に移し、各コントロール血清の 1 0 倍希釈を作製する。 30
- k . 検出抗体 (回復期のブタの血清) を、試料 3 μ l を希釈プレートの各ウェルに加えた 1 2 0 μ l のブロッキング液に移すことによって、 1 : 4 0 にブロッキング液で希釈する。毎回、異なった試料をウェル A - 1 、 B - 1 、 C - 1 等に加えることによって希釈する。 40
- l . 5 0 - 3 0 0 μ l マルチチャンネルピペットを使い、 1 列目のウェル内容物を少なくとも 3 回のピペッティングにより混合し、 5 0 μ l / ウェルを抗原コーティング L P S 結合検査プレートの 1 列目と 2 列目のウェルに移す。チップを交換し、希釈プレートの全希釈試料が移されるまで、このステップを繰り返す。
- m . 5 0 μ l / ウェルの陰性コントロール (1 1 列目のウェル A - H) を検査プレートの該当ウェルに 50

- 移す。陽性コントロールについても同様にする。
それぞれのコントロールには2つの検査プレートで使うのに十分な希釈試料が含まれている。
- n . 検査プレートをプレートシーラーでシールし、 37 ± 2.0 で1.0時間 \pm 15分間、インキュベートする。
- o . プレートを、ダイネックス ウルトラウォッシュプラスを使い、 $350 \mu\text{l}$ / ウェル、ソークタイム0秒の条件で、3回繰り返し、洗浄緩衝液で洗浄する。プレートをペーパータオルに叩きつけ、乾燥させる。
- p . $1:500$ あるいは適切な希釈率に希釈した、 $50 \mu\text{l}$ の酵素標識抗体を検査プレートの全ウェルに加える。必要な容量は=プレートの数 \times プレートあたり 5 ml 、である。
- q . 検査プレートをプレートシーラーでシールし、 37 ± 2.0 で1.0時間 \pm 15分間、インキュベートする。
- r . プレートを、ダイネックス ウルトラウォッシュプラスを使い、 $350 \mu\text{l}$ / ウェル、ソークタイム0秒の条件で、3回繰り返し、洗浄緩衝液で洗浄する。プレートをペーパータオルに叩きつけ、乾燥させる。
- s . 検査プレートの全ウェルに $50 \mu\text{l}$ の基質を加え、室温で5分間 \pm 1分間インキュベートする。
- t . 基質を加えた5分後に、 $50 \mu\text{l}$ の停止液を全ウェルに加え、反応を停止させる。
- u . 450 nm の波長フィルタを装備したプレートリーダー上でプレートを読む。

10

20

30

【0028】

3. 結果の解釈

- a . 波長 450 nm における吸光度 > 0.200 なる検査試料は、抗ローソニアLPS IgG抗体に対して陽性であると考察される。
- b . 波長 450 nm における吸光度 < 0.200 なる検査試料は、抗ローソニアLPS IgG抗体に対して陰性であると考察される。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/28464
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01);33/544(2006.01);C12P 19/04(2006.01);C07G 17/00(2006.01);A61K 39/02(2006.01) USPC: 435/7.1,7.32,7.92,101;536/123;424/234.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1,7.32,7.92,101;536/123;424/234.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, DIALOG		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOLYOAKE et al. Journal of Clinical Microbiology. August 1994, Vol. 32. No. 8, pages 1980-1985, see entire document.	1-12, 14-20 and 22-32
X, P	KROLL et al. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. June 2005. Vol. 12. No. 6. pages 693-699, see entire document.	1-33
X, P — Y, P	BOESEN et al. Veterinary Microbiology. 2005. Vol. 105, pages 199-206, see entire document.	1-12, 14-20 and 22-32 ----- 13, 21 and 33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 May 2006 (15.05.2006)		Date of mailing of the international search report 08 JUN 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Jennifer E. Graser <i>Manu Juklan</i> Telephone No. 571-272-0500

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ルーフ マイケル ビー .

アメリカ合衆国 50014 アイオワ州 エイムズ テューペロ サークル 3222

(72)発明者 アイクマイヤー マーク エー .

アメリカ合衆国 50035 アイオワ州 ボンドゥラント 77ティ-エイチ レーン ノース
イースト 10908

专利名称(译)	回肠炎诊断分析		
公开(公告)号	JP2008510145A	公开(公告)日	2008-04-03
申请号	JP2007525772	申请日	2005-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔.英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰兵务Vetomedika眼Enushi.		
[标]发明人	クロルジェレミージェイ ルーフマイケルビー アイクマイヤーマークエー		
发明人	クロル ジェレミー ジェイ. ルーフ マイケル ビー. アイクマイヤー マーク エー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/543 C07G99/00		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/569.F G01N33/543.545.A		
优先权	10/918006 2004-08-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于保护抗细胞内劳森氏菌抗体的改进的免疫测定方法，其允许在动物衍生的样品中快速且容易地检测低浓度的抗劳森氏菌抗体。优选的测定是使用胞内劳森氏菌的脂多糖的抗原提取物的ELISA测定。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/28464
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01);G01N 33/543(2006.01);C07G 19/00(2006.01);A61K 39/02(2006.01) USPC: 435/7.1,7.32,7.92,101,536/123;424/234.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S.: 435/7.1,7.32,7.92,101(536/123;424/234.1)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched WEST, DIALOG		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claims No.
X	HOLYOAKE et al. Journal of Clinical Microbiology, August 1994, Vol. 32, No. 8, pages 1580-1585, non patent document.	1-12, 14-20 and 22-32
X, P	KROJLJ et al. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, June 2005, Vol. 12, No. 6, pages 692-699, non patent document.	1-33
X, P	ROSHEN et al. Veterinary Microbiology, 2005, Vol. 105, pages 199-206, non patent document.	1-12, 14-20 and 22-32
Y, P		13, 21 and 33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family issue.		
* "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "Y" documents published after the international filing date or priority date and not to be considered with the applicant, but cited to substantiate the principles or theory underlying the invention. "X" entries applications or patent published on or after the international filing date. "X, P" documents which may derive priority (whereby) or which be cited to substantiate the publication date of another claim or other special reason (as specified). "Y" documents of particular relevance, the citation symbol carries the number of a Section of the Treaty under which the document is considered relevant or under which priority is claimed, such as 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.		
Date of the actual completion of the international search 15 May 2006 (15.05.2006)		Date of mailing of the international search report 18 JUN 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, APO, HIAFUS Copyright Office for Patents P.O. Box 1459 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 272-3201		Authorized officer Jennifer E. Grason Telephone No. 571-272-0590
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)		