VÚVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

Imunoenzymatická souprava pro sérologické rozlišení vakcinovaných prasat vakcínou proti salmonele a prasat po přirozené infekci netyfoidními sérovary salmonel (DIVA Salmo ELISA)

Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Natálie Králová, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
Mgr. Karolína Hlavová, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
RNDr. Iva Stoklásková
Mgr. Antonín Vašek
RNDr. Jaromír Pospíšil

6504
2025

Ověřená technologie

6504/2025

Imunoenzymatická souprava pro sérologické rozlišení vakcinovaných prasat vakcínou proti salmonele a prasat po přirozené infekci netyfoidními sérovary salmonel (DIVA Salmo ELISA)

Autoři:

Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Mgr. Natálie Králová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Mgr. Karolína Hlavová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

RNDr. Iva Stoklásková, TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Mgr. Antonín Vašek, TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

RNDr. Jaromír Pospíšil, TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektů Technologické agentury ČR a Ministerstva zemědělství (TQ03000656 a RO0523)

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno

ISBN 978-80-7672-063-3

Technická dokumentace

Účel použití

Imunoenzymatická souprava (DIVA Salmo ELISA) je určena k sérologickému průkazu protilátek proti antigenům *Salmonella* spp. u prasat a umožňuje rozlišení mezi zvířaty vakcinovanými inaktivovanou vakcínou BioSuis Salm proti salmonele a zvířaty infikovanými přirozenou cestou netyfoidními sérovary salmonel. Je vhodná pro monitorování nákazové situace v chovech, umožňuje identifikaci a vyřazení prasnic, které jsou nosičkami infekce, ale také pro kontrolu účinnosti vakcinace, jak u samotných prasnic, tak jejich selat po přenosu specifické kolostrální a laktogenní imunity.

Popis výrobku a princip metody

Souprava DIVA Salmo ELISA umožňuje detekovat přítomnost post-infekčních a/nebo post-vakcinačních protilátek ze séra prasat metodou EIA, typu nepřímá ELISA. Mikrotitrační desky jsou potaženy specifickými antigeny – post-vakcinační antigen (PV) a post-infekční antigen (PI). Každá deska v soupravě je potažena jiným antigenem. Na tyto antigeny se vážou specifické IgG protilátky z vyšetřovaných prasečích sér. V ideálním případě se testuje přítomnost post-infekčních a post-vakcinačních protilátek zároveň na obou deskách (případně stripech). Desky s antigeny a navázanými IgG protilátkami se inkubují se sekundární značenou protilátkou. Značená sekundární protilátka (konjugát) je zvířecí imunoglobulinová frakce proti prasečímu imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí chromogenního substrátu TMB, který zmodrá v případě pozitivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zabarvení na žluté. Intenzita žlutého zabarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku.

Použité antigeny v této soupravě jsou rekombinantně připravené, purifikované proteiny původem z bakterie *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, které se

přirozeně exprimují při infekci v hostitelském organismu (PI antigen) nebo je jejich produkce naopak potlačena (PV antigen). Ve vakcinačním kmeni je naopak PV antigen silně exprimován a PI antigen se produkuje jen ve velmi malém množství. Takto připravená vakcína včetně diagnostické soupravy, která je předmětem této Ověřené technologie, splňují parametry tzv. DIVA přístupu (Differentiating Infected from Vaccinated Animals).

Podmínky výroby

Výroba této soupravy je rozdělena do dvou fází. První je produkce dvou rekombinantních antigenů a jejich navázání na mikrotitrační destičky. Toto se provádí ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství. Druhá fáze výroby spočívá v přípravě všech potřebných roztoků a kompletaci samotné soupravy. Toto probíhá podle přísných standardů podniku TestLine Clinical Diagnostics.

Složení setu

- Potažené destičky
    - s navázaným PV nebo PI antigenem, 12 x 8 jamek (rozlamovatelné stripy) v sáčku se sušidlem
- Negativní kontrolní sérum
    - 20x koncentrované prasečí sérum neobsahující specifické protilátky
- Pozitivní kontrolní sérum
    - 20x koncentrované prasečí sérum obsahující specifické protilátky proti oběma antigenům
- Konjugát
    - 100x koncentrovaná sekundární protilátka proti prasečímu imunoglobulinu značená peroxidázou
- Ředící roztok vzorků 13
    - pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění
- Ředící roztok konjugátu 11
    - pufr se stabilizátory konjugátu, v pracovním ředění

- Chromogenní substrát TMB-Complete 2
    - jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H_2O_2 v pracovním ředění
- Promývací roztok
    - 20x koncentrovaný pufr
- Zastavovací roztok
    - roztok kyseliny v pracovním ředění

Pracovní postup pro vyšetření prasečích sér

Ředění vzorků sér a kontrolních sér

Důkladně promíchané vzorky a kontrolní séra (PKS a NKS) se ředí 1:20 Ředicím roztokem vzorků. Např.: 12 µl vzorku (kontrolního séra) + 228 µl Ředicího roztoku vzorků. Ředění se provádí v mikrozkumavkách mimo mikrotitrační destičky (viz. Pracovní postup). Naředěné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve. Negativní (NKS) i pozitivní (PKS) kontrolní séra jsou společná pro oba antigeny (PI i PV).

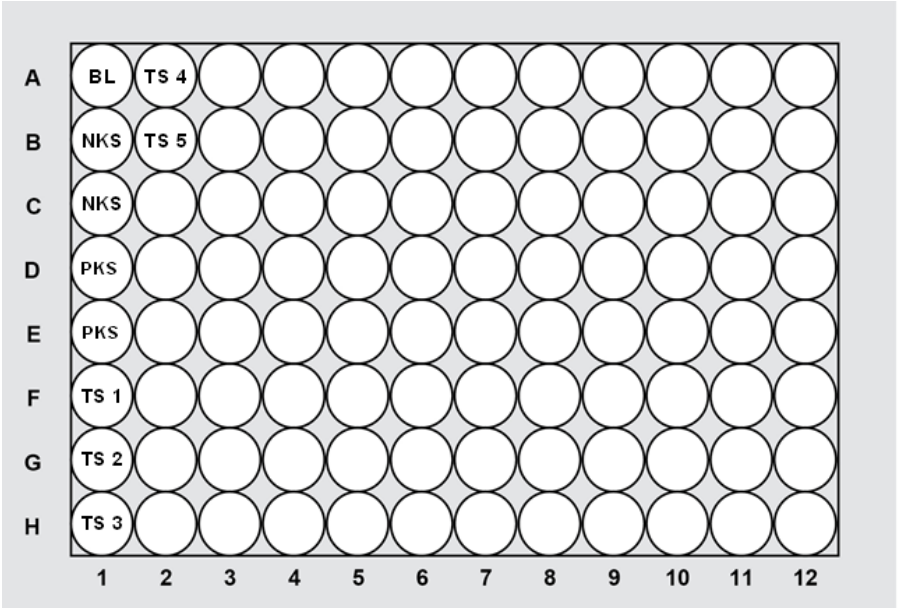
Pracovní postup

Všechny reagencie se nechají vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně se promíchají. Nepoužije-li se celá destička, zbylé stripy se vrátí zpět do obalu se sušidlem, hermeticky uzavře a skladuje při +2 °C až +8 °C. Důsledně chráníme před vlhkostí! Pracuje se paralelně s destičkou (stripy) s PI antigenem a PV antigenem.

1. Kontroly a ředěné vzorky se dávkují podle pracovního schématu.
    - Pipetuje se 100 µl Ředicího roztoku vzorků do jamky A1 (blank).
    - Pipetuje se 100 µl ředěného Negativního kontrolního séra v Ředicím roztoku vzorků do 2 jamek (B1, C1).
    - Pipetuje se 100 µl ředěného Pozitivního kontrolního séra v Ředicím roztoku vzorků do 2 jamek (D1, E1).
    - Pipetuje se 100 µl testovacích vzorků ředěných v Ředicím roztoku vzorků do zbývajících jamek (F1 – H12).
2. Destička se přikryje víčkem a inkubuje 60 min při laboratorní teplotě.

3. Obsah jamek se odsaje a 4krát promyje pracovním promývacím roztokem. Jamky se plní po horní okraj. Na závěr se důkladně vyklepou zbytky roztoku do savého materiálu.
4. Dávkuje se do všech jamek 100 µl pracovního roztoku konjugátu ředěného v Ředícím roztoku konjugátu.
5. Destička se přikryje víčkem a inkubuje 60 min při laboratorní teplotě.
6. Obsah jamek se odsaje a 4krát promyje pracovním promývacím roztokem. Jamky se plní po horní okraj. Na závěr se důkladně vyklepou zbytky roztoku do savého materiálu.
7. Dávkuje se do všech jamek 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete.
8. Destička se přikryje víčkem a inkubuje 10 minut při laboratorní teplotě.
9. Reakce se zastaví přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
10. Pomocí fotometru se při vlnové délce 450 nm změří intenzita zbarvení roztoků ve všech vyšetřovacích jamkách, a to do 30 min od zastavení reakce.

Pracovní schéma



BL 100 µl Ředícího roztoku vzorků (Blank)

NKS 100 µl ředěného negativního kontrolního séra v Ředícím roztoku vzorků

PKS 100 µl ředěného pozitivního kontrolního séra v Ředícím roztoku vzorků

TS 1-x 100 µl ředěných testovacích sér v Ředícím roztoku vzorků

Validita testu

Test je platný, jestliže absorbance blanku je menší než 0,200.

BLANK < 0,200

Absorbance Negativního kontrolního séra je menší než 1/3násobek absorbance Pozitivního kontrolního séra.

NKS < 1/3x PKS

Absorbance Pozitivního kontrolního séra je vyšší než 0,500.

PKS > 0,500

Nejsou-li tyto požadavky splněny, je výsledek testu neuspokojivý a musí být opakován.

Interpretace výsledků

V prvním kroku odečteme od absorbance jednotlivých vzorků (včetně pozitivní a negativní kontroly) absorbanci Blanku.

TS (NKS, PKS) - BLANK

Výpočet poměru S/P

Průměrnou absorbanci testovaného vzorku dělíme průměrnou absorbancí Pozitivního kontrolního séra (PKS) naměřenou v téže sérii vyšetření:

$$S/P = \frac{\text{Průměrná absorbance vzorku}}{\text{Průměrná absorbance PKS}} \times 100\ [\%]$$

Interpretace výsledků vyšetření uvádí tabulka (Tabulka 1).

Tabulka 1 Interpretace výsledků vyšetření

Poměr S/P [%]	**Hodnocení**
menší než 20	negativní
20 až 40	hraniční
větší než 40	pozitivní

V případě hraničního výsledku se doporučuje vyšetření opakovat z nového odběru.

Biologická relevance výsledků

Pozitivní hladiny protilátek proti post-infekčnímu antigenu (PI) znamenají prodělání infekce *Salmonella* spp. Pozitivní hladiny protilátek proti post-vakcinačnímu antigenu (PV) znamenají účinnou vakcinaci prasat vakcínou BioSuis Salm. Pozitivní hladiny protilátek proti oběma antigenům znamenají prodělanou infekci u prasat, kterým byla aplikovaná zmíněná vakcína.

Kompletace soupravy

Obrázek 1 *Dva kusy totožných **z**kompletovaných souprav DIVA Salmo ELISA s jednotlivými komponentami popsanými v sekci Složení setu. Součástí každé soupravy jsou dvě mikrotitrační destičky potažené post-infekčním (PI), resp. post-vakcinačním antigenem (PV).*

Skladování

Souprava se skladuje při teplotě +2 °C až +8 °C. Při dodržení skladovacích podmínek platí expirace uvedená na obalu soupravy. Po otevření je doporučeno soupravu spotřebovat do 3 měsíců. Souprava nesmí zmrznout!

Jako vzorek k vyšetření je použito prasečí sérum. Vyšetřované vzorky séra je možné uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně 48 hod. Při delším skladování se vzorky zamrazí na -20 °C. Pokud je vzorek séra nehomogenní, doporučuje se jej před vyšetřením odstředit. Nesmí se vyšetřovat hemolytická séra, výsledky mohou být zkreslené.

Expirace

Expirace takto připravené soupravy je nejméně 6 měsíců od data výroby při dodržení podmínek skladování.

Reference

GEBAUER J, KUDLÁČKOVÁ H, KOSINA M, KOVAŘČÍK K, TESAŘÍK R, OSVALDOVÁ A, FALDYNA M, MATIAŠOVIC J: A proteomic approach for a development of DIVA ELISA differentiating pigs infected with Salmonella Typhimurium and pigs vaccinated with Salmonella Typhimurium-based inactivated vaccine. BMC Vet Res, 2016

MATIAŠOVIC J, GEBAUER J, KUDLÁČKOVÁ H, KOSINA M, KOVAŘČÍK K, TESAŘÍK R, OSVALDOVÁ A: Použití antigenů Salmonella enterica ssp. enterica sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat. Patent. číslo: 305077, 2015

KOSINA M, MATIAŠOVIC J, GEBAUER J, KUDLÁČKOVÁ H, LEVÁ L, HAVLÍČKOVÁ H, VRZAL V, ŠIŠÁK F: Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů Salmonella Derby, Infantis a Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat. Funkční vzorek, 2015

GEBAUER J, TESAŘÍK R, KUDLÁČKOVÁ H, MATIAŠOVIC J: Vakcína proti infekci Salmonella Typhimurium. Užitný vzor UV033402, 2019

GEBAUER J, TESAŘÍK R, KRÁLOVÁ N, MATIAŠOVIC J: Optimalizace exprese rekombinantních antigenů pro zvýšení výtěžnosti a testování stability a specifity těchto proteinů pro použití v komerční ELISA soupravě. Funkční vzorek, 2024

Ověření funkčnosti

Funkčnost soupravy – tedy schopnost sérologicky rozlišit prasata po infekci a po vakcinaci byla po sestavení hotové soupravy ověřena na pracovišti TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., podle standardních postupů a podle návodu na sadě prasečích sér se známou historií.

PV antigen:

vzorek	absorbance	A-Blank	S/P poměr	historie
BLANK	0,039	0,000	0,00	
NKS	0,126	0,087	5,93	-
PKS	1,505	1,466	100,00	+
Su2	0,054	0,015	1,02	-
Su3	0,102	0,063	4,30	-
20K	0,095	0,056	3,82	-
Su6	0,061	0,022	1,50	-
Su8	0,095	0,056	3,82	-
1STM	0,080	0,041	2,80	-
482	1,652	1,613	110,03	+
484	0,833	0,794	54,16	+
464	1,130	1,091	74,42	+
B80	1,605	1,566	106,82	+

PI antigen:

vzorek	absorbance	A-Blank	S/P poměr	historie
BLANK	0,039	0,000	0,00	
NKS	0,105	0,066	4,41	-
PKS	1,535	1,496	100,00	+
Su2	0,091	0,052	3,48	-
Su3	0,136	0,097	6,48	-
20K	0,090	0,051	3,41	-
Su6	0,879	0,840	56,15	+
Su8	2,087	2,048	136,90	+
1STM	1,173	1,134	75,80	+
482	0,121	0,082	5,48	-
484	0,085	0,046	3,07	-
464	0,115	0,076	5,08	-
B80	0,665	0,626	41,84	+

U obou měření byla splněna kritéria validity testu

BLANK < 0,200

NKS < 1/3x PKS

PKS > 0,500

Celkové hodnocení S/P poměru je značen barevně podle tabulky:

S/P poměr	Hodnocení
menší než 20	negativní
20 až 40	hraniční
větší než 40	pozitivní

Protokol o ověření technologie je přiložen na konci textu.

Protokol o ověření technologie

Technologie výroby soupravy DIVA ELISA

Navržená technologie je výsledkem projektu: *Vývoj DIVA ELISA testu rozlišujícího prasata infikovaná netyfoidními sérotypy salmonel a prasata vakcinovaná proti těmto sérotypům č. TQ03000656*“

Zpracovatel technologie – Výzkumný tým projektu:

Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Mgr. Natálie Králová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Mgr. Karolína Hlavová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
RNDr. Iva Stoklásková, TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
RNDr. Jaromír Pospíšil, TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
Mgr. Antonín Vašek, TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Ověřovatel technologie:

společnost TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Název ověřené technologie:

Imunoenzymatická souprava pro sérologické rozlišení vakcinovaných prasat vakcínou proti salmonele a prasat po přirozené infekci netyfoidními sérovary salmonel (DIVA Salmo ELISA)

Předmět ověřování:

Předmětem ověření je ELISA souprava, která umožňuje sérologicky rozlišit prasata po infekci netyfoidními sérotypy salmonel a prasata vakcinovaná komerční vakcínou BioSuis Salm, která byla vyvinuta kolektivem autorů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. ve spolupráci s Bioveta, a.s.. Základem soupravy je detekce specifických IgG protilátek ze séra prasat, vázajících se na post-infekční, resp. post-vakcinační antigen, čímž jsou rekombinantní proteiny připravené autory výzkumné organizace. Souprava je založena na nepřímém ELISA testu, kdy jsou na mikrotitrační desky naneseny zmíněné rekombinantní antigeny, na které se vážou sérové protilátky, které se dále detekují sekundární protilátkou pomocí kolorimetrické reakce. Předmětem ověření je tak schopnost vyrobit funkční ELISA soupravu, včetně všech nezbytných komponent, která dokáže potvrdit přítomnost post-infekčních a/nebo post-vakcinačních protilátek ze sér vyšetřovaných prasat.
Ověření postupu výroby soupravy bylo provedeno na základě dodaných vzorků mikrotitračních desek potažených dvěma antigeny – post-infekční (PI) a post-vakcinační (PV) antigen, dále vzorky negativních a pozitivních kontrolních sér a konjugátu (sekundární protilátka). Práce byla provedena v plném rozsahu výrobního postupu podle interních standardů výroby. Po kompletaci několika kusů souprav, bylo následně provedeno ověření

funkčnosti soupravy s dodanými prasečími séry o známé historii ve vztahu k salmonelové infekci/vakcinaci.

Ověřující pracoviště:

TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Termín ověření:

Listopad 2025 – prosinec 2025

Technická dokumentace:

viz. Příloha - Technická dokumentace výsledku

Závěrečné konstatování:

Technologie byla ověřena formou kompletního výrobního postupu ELISA soupravy od dodání kritických komponent ze strany výzkumné organizace, přes výrobu všech použitých roztoků (nekritických komponent) až po kompletaci finální soupravy do podoby potenciálního komerčního produktu. Následně byla úspěšně ověřena funkčnost takto připravené soupravy ve smyslu schopnosti detekovat přítomnost post-infekčních a/nebo post-vakcinačních IgG protilátek (viz Ověření funkčnosti v Technické dokumentaci).

Předkládaná technologie má výrazný potenciál pro monitoring salmonelových nákaz v chovech prasat, umožňuje identifikaci a vyřazení prasnic, které jsou nosičkami infekce, ale také pro kontrolu účinnosti vakcinace, jak u samotných prasnic, tak jejich selat po přenosu specifické kolostrální a laktogenní imunity. Může tak zároveň přispět ke zvýšení užitných vlastností zmíněné komerční inaktivované vakcíny BioSuis Salm, vyvinuté kolektivem autorů.

V Brně dne 12. 12. 2025

RNDr. Michal Beránek, Ph.D., MBA

Digitálně podepsal RNDr. Michal Beránek, Ph.D., MBA
Datum: 2025.12.14 21:38:12 +01'00'

.....

RNDr. Michal Beránek, Ph.D., MBA
Jednatel TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

VÚVeL

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz