



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-12/738- -00000-0000
FEC: 2006-12-20 17:22:21 Udp: 2020 NUECREACIONES
Itr: 11 PATENTE IYH
EVS: 3/8 FASE NACIONAL
Act 411 REPRESENTACION

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA GMBH**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de República Federal de Alemania.

Dirección: Binger Strasse 173
55216 Ingelheim
República Federal de Alemania

Domicilio: 55216 Ingelheim
República Federal de Alemania

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4
INVENTOR (ES)
(72)

1. **Malik MERZA**
Flogstavaegen 150
75272 Uppsala
Suecia

5
PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/006781 Fecha: 23 de junio de 2005
Publicación Internacional No. WO 2006/012949 A1 Fecha: 9 de febrero de 2006

6
Título (54)
MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS

7
Clasificación Internacional (51) G01N 33/68

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	<u>EP</u> <u>EP</u>	<u>24 de junio de 2004</u> <u>16 de noviembre de 2004</u>	<u>04014804.1</u> <u>04027193.4</u>

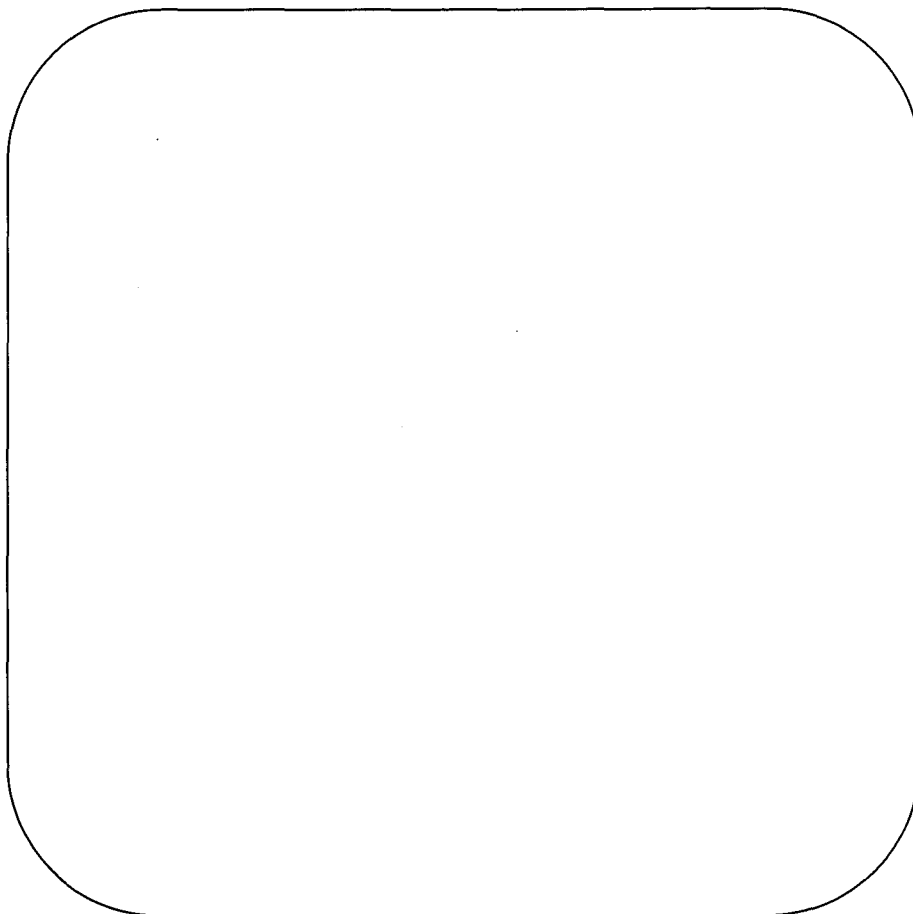
9
Comprobante de pago No.: 06-94,104 Fecha: 11 de Diciembre de 2006

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

REPRESENTACION Y PODER

Für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen,
Dienstleistungsmarken, Handelsnamen und
Embleme.

Para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica y de servicios; nombres comerciales y enseñas.

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

ICH (wir) Unterzeichnende (r) / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

wohnhaft in / domiciliado (s) en D-55216 Ingelheim am Rhein
Federal Republic of Germany

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos;

ernenne(n) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 des Artikels 543 des Handelsgesetzbuches GERMAN CAVELIER (Rechtsanwaltsausweis Nr. 832), GONZALO PERDOMO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 831), EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929) und LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª Nº 72-35 zu meinen (unseren) Prozeßbevollmächtigten (Germán CAVELIER zum Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge - zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das Gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozeßbevollmächtigten und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn GERMAN CAVELIER bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter den ersten, oder aber der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO oder LUZ CLEMENCIA DE PAEZ aber - je nach Fall die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die vorübergehende Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erlaube ich Ihnen wir den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht den Schutz meines (unseres) Gewerblichen Eigentums und bei Unlauterem Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig, ob diese rechtsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allem vor den Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, als auch vor den Schiedsgerichten und zwar in allen Fragen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: a) Erlangung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmustern, Industriezeichnungen, die Eintragung von Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen und Emblemen, Gemüsearten und

A la vuelta $\rightarrow$

Weiter $\rightarrow$

acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Herkunftsbezeichnungen, ihre Erneuerung, Übertragung, Änderung des Namens oder des Geschäftssitzes, der freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen unlauteren Wettbewerbs, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüchen, verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen, Konzessionen, Lizenzen, der "tutela" und allgemein für zivil-, straf-, verwaltungsrechtlichen und verwaltungsgerichtlichen Prozessen, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen oben genannten Angelegenheiten einen Unterbeauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schlichten, Prozeßsachverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen zu genehmigen.

Geschehen und unterzeichnet am/Dado y firmado hoy August 2, 1996

Ingelheim am Rhein

in/en

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

ppa.

Unterschrift

Firma

Reinhold Fleschhut

Dr. Dieter Laudien

Managing Director
LEGALIZACION

Director of Corporate Patent Department
BEGLAUBIGUNG

Es necesaria la legalización con certificado consular sobre la existencia legal de la compañía, que éste ejerce su objeto social y que la persona que otorga el poder está autorizada para ello. A este efecto les solicitamos que muestren al Cónsul las pruebas que acreditan estos hechos.

Es wird eine Beglaubigung und eine Konsularbescheinigung darüber benötigt, daß die Gesellschaft rechtlich besteht, daß sie ihren Gesellschaftszweck erfüllt und daß die Person, die die Vollmacht erteilt, dazu rechtlich befugt ist. Zu diesem Zweck bitten wir Sie höflich, dem Konsul die entsprechenden Nachweise vorlegen zu wollen.



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

UR.Nr. 1656 / 96 V

Umseitige, vor mir gefertigte Namensunterschriften von:

1. Herrn (Dr.) Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Herrn Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,

- mir vorgestellt durch die Sekretärin Frau Ingrid May, dienstansässig bei der Firma Boehringer Ingelheim GmbH, die sich durch Vorlage ihres Führerscheines ausgewiesen hat -

beglaube ich hiermit.

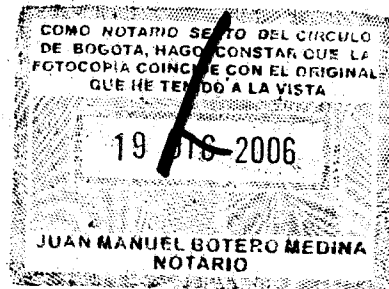
Aufgrund meiner heutigen Einsicht in das Handelsregister des Amtsgerichts Bingen bescheinige ich hiermit:

Die Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein wurde am 12. Juni 1978 im Handelsregister unter HR B 1491 eingetragen und die Herren (Dr.) Reinhold Fleschhut und Dr. Dieter Laudien sind gemeinsam zur Vertretung der Gesellschaft berechtigt.

Weiter bescheinige ich, daß die Gesellschaft ihren Sitz in Ingelheim am Rhein hat.

Gegenstand des Unternehmens ist die Entwicklung, die Herstellung und der Vertrieb von veterinärmedizinischen Präparaten und anderen Produkten zur Gesunderhaltung von Tieren.

Ingelheim am Rhein, den 02. August 1996/hün

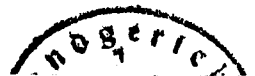
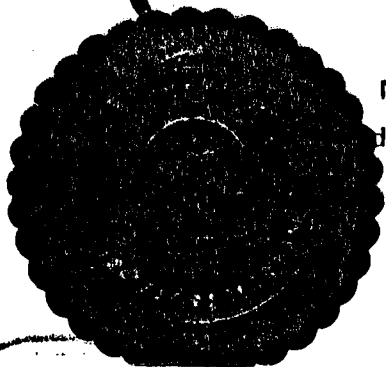


Notarassessor als amtlich bestellter Vertreter

des Notarassessors Dr. Peter Wirth als amtlich

bestelltem Notariatsverweser anstelle von

Notar Justizrat Prof. Weirich in Ingelheim





- 910 E 1 -

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des Notarassessors Dr Scholl als amtlich bestellter Vertreter des Notarassessors Dr. Peter Wirth - Notariatsverweser anstelle des Notars Prof. Dr. Weirich in Ingelheim und die Echtheit des beigedrückten Dienst-stempels-siegels werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Kostenberechnung:
Gebühr für Legalisation
(Wert: DM *1000,-*)
KostO. v. 26.7.1957
BGBl. I S. 861
DM *ab-*

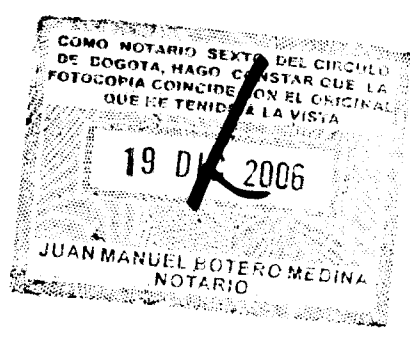
Mainz, den 8. AUG. 1996

Amtsbeschriftung



Mainz, den neunten August neunzehnhundertsechszundneunzig
Der Präsident des Landgerichts

Dr. Hanns Paul Tüttenberg
(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)





CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
MUNICH

Nr. 131

El suscrito Cónsul General de Colombia

CERTIFICA:

Que el señor(a) **Dr. HAS PAUL TÜTTENBERG**, quién auteteca la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional de Mainz.-----

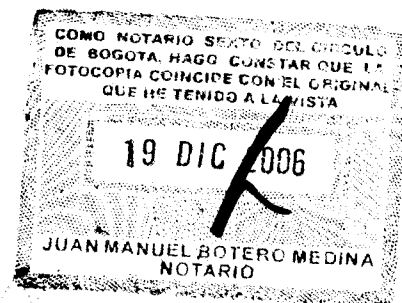
Que la firma **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** está registrada en el Registro Mercantil del Juzgado Municipal 653 de Bingen / Rhein, bajo el número **HR B 1491** y que está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las Leyes de la República de Alemania.-----

Que el señor **Dr. DIETER LAUDIN** y el Señor **REINHOLD FLESCHHUT**, quién(es) firma(n) el presente documento tiene(n) facultad legal y suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre.-----

Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior. -----

Munich, a 23 de agosto de 1996


RICARDO MOSQUERA MESA
Cónsul General de Colombia



Derechos para la Nación	US \$ 6.-
Fondo Rotatorio	US \$ 100.-
Tasa Consular	US \$ 1,00 = DM 1.60 = DM 169.60

SECRET

0
2
0
—
0
1

CALLZ/CID:23
-ADTAD:CA

SECRET

100

CUYA FINEZA
DOCUMENTOS
LAS FUNCIONES

CURAFINMA ~~FRANCO~~ ~~FRANCO~~
DOCUMENTO DESARROLLO
LAS FUNCIONES INDICADAS

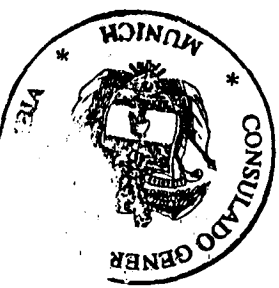
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

205408

JEFE DE LEGALIZACIONES
SECRETARIE DE PODOTIA D.C.

100-443887-100

NO SEASIDE
RESPONSES TO THE



5700-108-7.8 AND 0.00

67.969

1044-101-21112901-12040102

78

TRADUCCION OFICIAL No. 5446

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

(A continuación de la representación y el poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO tpa, 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien:)

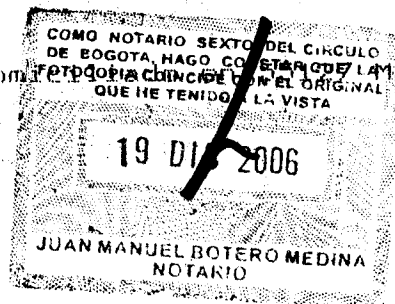
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Asociación No. 506 Ministerio

Legalización

Protocolo notarial No. 1656/96 V

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores:

1. Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.Chem. domiciliado en 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Dr. Dieter Laudien, Dipl. Chim., domiciliado en Mainz, Carl-Orff-Straße 11,



9/9

-presentados por la secretaria señora Ingrid May, con domicilio comercial en la Boehringer Ingelheim GmbH, quien a su vez se identificó con su licencia de conducción-.

Igualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen:

Que la firma Boehringer Vetmedica Ingelheim GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, fue inscrita bajo el No. HR B 1491 el 12 de junio de 1978 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad. Además certifico que el domicilio de la sociedad es Ingelheim am Rhein.

El objeto social es el desarrollo, producción y venta de preparados médico-veterinarios y otros productos para la salud animal.

Ingelheim am Rhein, 2 de agosto de 1986

(Hilo y oblea roja en relieve:)

El notario suplente - Ingelheim

COPIA NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTÁ
DEBOYER
1986
COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
Fdo.: firma ilegible
19 DIC 2006
El notario suplente
del notario de Ingelheim
JUAN MANUEL MEDINA
NOTARIO
Prof. Dr. Weirich

10

(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz y en
hojita adjunta)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del Dr.
Scholl como notari suplente del Dr. Peter Wirth, notario suplente
del Prof. Dr. Weirich, notario de Ingelheim, y la del sello
oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el
mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto
oficial.

Mainz, nueve de agosto de mil novecientos
noventa y seis

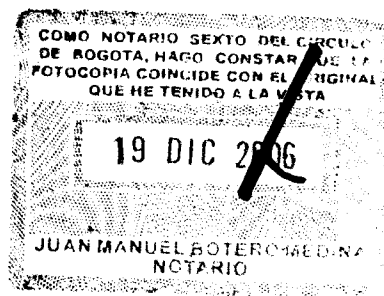
El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

Costas

Derechos de legalización
(Valor:DM 5.000,-)
JVKostO del 26 de julio 1957
Gacetas Oficial I Pag. 861
DM 20,--
Mainz, 13 de diciembre de 1995
Fdo.: firma ilegible
Inspector



H
11

EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el Consulado de Colombia en Munich (Certificación) bajo el No. 131 del 23 de agosto de 1996, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el No. 205408 del 6 de septiembre de 1996.

Pagados derechos y Fondo Rotatorio US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Santafé de Bogotá, 10 de septiembre de 1996.

[Handwritten signature]
Notario Sexto de Bogotá

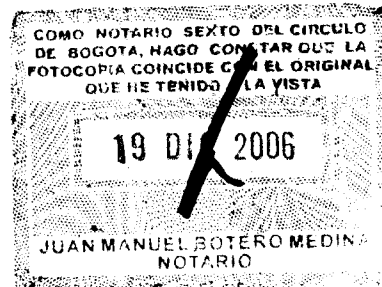
COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE _____

C. C. _____

COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLOS)
EN ESTA NOTARIA..

16 SET. 1996

SANTAFE DE BOGOTA, D.C.



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

La 3 de 2006

208896

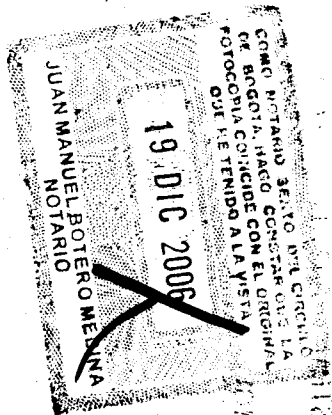
De Hernandez

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMPLE
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1946 SET 13 11:32

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



ATENCION DE 1946 SET 13 11:32

19 DEC 2006

1946 SET 13 11:32

1946 SET 13 11:32

12
12

CAVELIER

ABOGADOS

TELEFAX: (57) (1) 2358850
CABLES CAVELEYES
TELEX: 45479

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª, No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO: (57) (1) 2120100

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

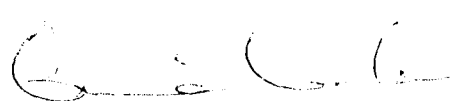
Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Poder conferido el: 02-08-96

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,

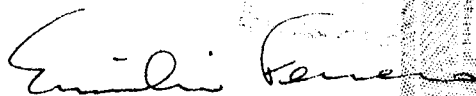


GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

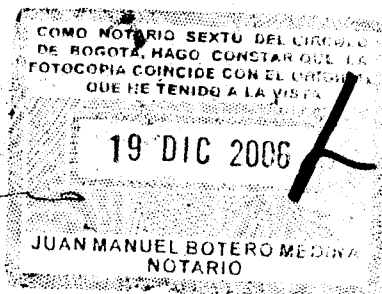
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



NOTARIA SEXTO DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y AUTENTICACIÓN PERSONAL

Santafé de Bogotá D. C.

Ante Mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ

Comparecieron personalmente,

[Firma] *[Firma]*

quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.

y la(s) Libreta(s) Militar(es):

438019
2877924
77632 7721924

Yo, el Notario, JUAN MANUEL BOTERO MEDINA, declaro que la(s) firma(s) que
a continuación se expresan son de quien(es) es(son) la(s) suya(s) y que
cumplen con la diligencia.



4726

Case 1-1729
13

CAVELIER

374

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CALLE 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA



CESION

ASSIGNMENT

nosotros) abajo firmado (s)

Malik MERZA

Domiciliado(s)

en

Flogstavaegen 150, 752 72 Uppsala, Sweden

Declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s)
inventor(es) de la invención:

METODO DE DIAGNOSTICO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin
Limitación, a favor de la sociedad

Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

constituida y existente de conformidad con las leyes de

Alemania

domiciliada en **Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim,**
Alemania

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de
invención correspondiente en la República de Colombia.

I (we), the undersigned

Malik MERZA

of

Flogstavaegen 150, 752 72 Uppsala, Sweden

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

"Method of diagnosing Lawsonia intracellularis"

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
of **Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH**

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of

Germany

Domiciled in **Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim,**
Germany

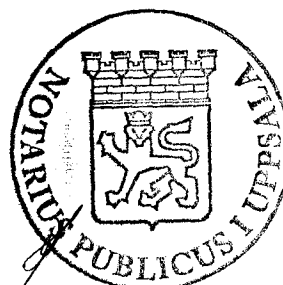
all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding
patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this Nov. 30, 2006

en/in Uppsala - SWEDEN

Firma/Signature

Malik MERZA



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____

de 200 ____ Ante mí, Notario Público de _____

compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
 persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
 tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this 30th day of November200 6 before me, a Notary Public ofUppsala, Swedenpersonally appeared Malik Merza

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
 that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
 execute it.

NOTARIO PÚBLICO-NOTARY PUBLIC _____

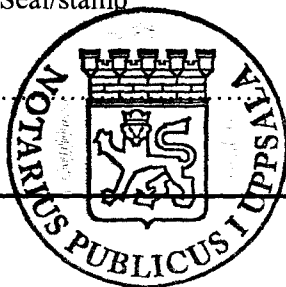
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: Sweden
- This public document
2. has been signed by Lars la Fleur
3. acting in the capacity of Notary Public, Sweden
4. bears the seal/stamp of Notarius Publicus at Uppsala

Certified

5. at Uppsala, Sweden
6. the 30 November 2006
7. by Mathias Pryge
8. No. 644
9. Seal/stamp
10. Signature



25
B

TRADUCCIÓN OFICIAL 327/2006 DE UN DOCUMENTO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA. DE ACUERDO CON DICHO DOCUMENTO **MALIK MERZA**, DOMICILIADO EN FLOGSTAVAEGEN 150, 752 72 UPPSALA, SUECIA, DECLARA BAJO JURAMENTO SER EL INVENTOR ÚNICO Y VERDADERO DE LA INVENCION **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS**. ADEMÁS QUE CEDE SIN RESERVAS NI LIMITACIONES EN FAVOR DE **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH**, UNA SOCIEDAD CONSTITUIDA Y EXISTENTE DE CONFORMIDAD CON LAS LEYES DE ALEMANIA, DOMICILIADA EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM, ALEMANIA, TODOS LOS DERECHOS INHERENTES A DICHA INVENCION Y QUE LA CITADA COMPAÑÍA QUEDA FACULTADA PARA SOLICITAR EN SU NOMBRE LA PATENTE CORRESPONDIENTE EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA. DADO Y FIRMADO HOY 30 DE NOVIEMBRE DE 2006 EN UPPSALA, SUECIA.

FIRMADO: MALIK MERZA

Sello: Se certifica que MALIK MERZA ha nombrado personalmente este documento. Uppsala, Suecia, 30 de noviembre de 2006.

Ex officio: (firma ilegible) Notario público, Lars la Fleur.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

El 30 de noviembre de 2006, ante mí, notario público de Uppsala, Suecia, compareció personalmente MALIK MERZA, a quien conozco y de quien me consta es la persona firmante del documento precedente y quien posee la capacidad legal para firmarlo.

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAÍS: SUECIA

Este documento público

2. ha sido firmado por LARS LA FLEUR

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE UPPSALA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 DEC 19 P 12:49

recs

OFICE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

503265

Eduardo Calado

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEN
LAS FIRMAS INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) Eduardo Calado Noguera

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 19 DIC 2006

[Signature]

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 February 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/012949 A1

(51) International Patent Classification⁷: **G01N 33/68**

(21) International Application Number:
PCT/EP2005/006781

(22) International Filing Date: 23 June 2005 (23.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
04014804.1 24 June 2004 (24.06.2004) EP
04027193.4 16 November 2004 (16.11.2004) EP

(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
[DE/DE]; Binger Str. 173, 55216 INGELHEIM (DE).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **MERZA, Malik**
[SE/SE]; Flogstavaegen 150, S-752 72 UPPSALA (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): 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.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological
material furnished under Rule 13bis separately from the
description

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING LAWSONIA INTRACELLULARIS

(57) Abstract: The present invention relates to the field of animal health and in particular to *Lawsonia intracellularis*. In particular, the invention relates to a method of diagnosing *Lawsonia intracellularis* infection and a diagnostic test kit using *Lawsonia intracellularis*-specific antibodies. The invention also relates to the use of the method or test kit for diagnosing *Lawsonia intracellularis* infections.

WO 2006/012949 A1

METHOD OF DIAGNOSING LAWSONIA INTRACELLULARIS

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to the field of animal health and in particular to *Lawsonia intracellularis*. In particular, the invention relates to a method of diagnosing *Lawsonia intracellularis* infection and a diagnostic test kit using *Lawsonia intracellularis*-specific antibodies. The invention also relates to the use of the method or test kit for diagnosing *Lawsonia intracellularis* infections.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

L. intracellularis, the causative agent of porcine proliferative enteropathy ("PPE"), affects virtually all animals, including humans, rabbits, ferrets, hamsters, fox, horses, and other animals as diverse as ostriches and emus. *L. intracellularis* is a
15 particularly great cause of losses in swine herds in Europe as well as in the United States.

A consistent feature of PPE is the occurrence of intracytoplasmic, non-membrane bound curved bacilli within enterocytes in affected portions of intestine. The
20 bacteria associated with PPE have been referred to as "Campylobacter-like organisms." S. McOrist *et al.*, Vet. Pathol., Vol. 26, 260-264 (1989). Subsequently, the causative bacteria have been identified as a novel taxonomic genus and species, vernacularly referred to as *Ileal symbiont* (IS) intracellularis. C. Gebhart *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1993).
25 More recently, these novel bacteria have been given the taxonomic name *Lawsonia* (*L.*) *intracellularis*. S. McOrist *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820-825 (1995). These three names have been used interchangeably to refer to the same organism as further identified and described herein.

30

19
19

L. intracellularis is an obligate, intracellular bacterium which cannot be cultured by normal bacteriological methods on conventional cell-free media and has been thought to require attached epithelial cells for growth. S. McOrist *et al.*, Infection and Immunity, Vol. 61, No. 19, 4286-4292 (1993) and G. Lawson *et al.*, J. of Clinical Microbiology, Vol. 31, No. 5, 1136-1142 (1993) discuss cultivation of *L. intracellularis* using IEC-18 rat intestinal epithelial cell monolayers in conventional tissue culture flasks. In addition, H. Stills, Infection and Immunity, Vol. 59, No. 9, 3227-3236 (1991) discusses using Intestine 407 human embryonic intestinal cell monolayers and GPC-16 guinea pig colonic adenocarcinoma cell monolayers in conventional tissue culture flasks.

In particular, *L. intracellularis* can be cultivated by methods known in the art, preferably, according to United States Patent Nos. 5,714,375 and 5,885,823. For example, culture cells may first be inoculated with an inoculum comprising *L. intracellularis* bacteria so as to infect the cells with the bacteria. Numerous cell lines can be used in practicing the invention, including, but not limited to, IEC-18 (ATCC 1589)-rat intestinal epithelial cells, HEp-2 (ATCC 23)-human epidermoid carcinoma cells, McCoy's (ATCC 1696)-mouse (non-specified) cells, BGMK (Biowhittaker #71-176)-buffalo green monkey kidney cells, and swine intestinal epithelium cells. The preferred culture cells are HEp-2, McCoy's or IEC-18 cells.

If culture cells are used, prior to being inoculated, the cells may be in the form of a monolayer. To form a monolayer, the cells may be seed into conventional flasks. Each flask is generally seeded with between about 1×10^5 cells to about 10×10^5 cells per 25, 75, 150, 850 cm² flask or roller bottle mixed with growth media. The growth media may be any media for cell cultivation which includes a nitrogen source, necessary growth factors for the chosen culture cells, and a carbon source, such as glucose or lactose. The preferred media is DMEM fortified with Ham's F 12 with 1-5% fetal bovine serum, although other commercially available media may be used with good results.

20

Successful cultivation of *L. intracellularis* is enhanced by maintaining the culture cells in a constant state of growth. Therefore, the culture cell monolayer should be at about 20 percent to about 50 percent confluency at the time of inoculation. Preferably, the cells should be at about 30 percent to about 40 percent confluency
5 at the time of inoculation, most preferably at about 30 percent confluency.

Alternatively, the cells, prior to being inoculated, may be grown in suspension, as described *infra*. Preferably, the cells are first grown to 100% confluency in the form of a monolayer in an adherent type system, e.g., a roller bottle system, and
10 then transferred to 3-3000 liters and grown in suspension.

The inoculum may be a culture of *L. intracellularis* obtained from infected swine or other animals.

15 The inoculum can be an intestinal homogenate prepared by scraping the mucosa off of the ileum of a swine or other animal infected with PPE. When preparing an intestinal homogenate, ileal sections selected for culture should show severe lesions with gross thickening of the gut. Due to the fragile nature of the bacteria, samples should preferably be stored at -70°C as quickly as possible after
20 necropsy. An antibiotic to which *L. intracellularis* is resistant such as Vancomycin, Amphotericin B or members of the aminoglycoside group of antibiotics, including Gentamicin and Neomycin, to name a few, is preferably added to the inoculum to suppress contaminating bacteria while permitting *L. intracellularis* growth. Whether the inoculum is a pure culture or an intestinal homogenate, inoculation of
25 the culture cells can be performed by various techniques known in the art, given the teachings herein.

The bacteria and/or inoculated culture cells are then incubated under a reduced dissolved O₂ concentration. At dissolved oxygen concentrations greater than 10%
30 *L. intracellularis* growth is less than optimal with cessation of growth eventually occurring at oxygen concentrations outside this range. Preferably, the bacteria

21
21

and/or inoculated culture cells are incubated in a dissolved oxygen concentration in the range of about 0% to about 10%. More preferably, the bacteria and/or cells are incubated in an oxygen concentration in the range of about 0% to about 8%, with an oxygen concentration of about 0% to about 3.0% being most preferred.

5

The proper concentration of carbon dioxide is also important to the proper growth of *L. intracellularis*. At carbon dioxide concentrations greater than 0% and less than 4%, non-optimum growth occurs with cessation of growth eventually occurring at carbon dioxide concentrations outside this range. Preferably, the carbon dioxide concentration is in the range from about 6% to about 10%, with a carbon dioxide concentration of about 8.8% being most preferred.

In addition, the cells are preferably incubated at a hydrogen concentration in the range from about 73% to about 96%. Nitrogen may be used in place of some or all of the hydrogen present. Most preferably, the cells are incubated in about 0 to about 8.0% O₂, about 8.8% CO₂, and about 83.2% H₂.

Inoculated cells may be incubated in a dual gas incubator or other gas chambers which contains the proper hydrogen, oxygen and carbon dioxide concentrations and which allows the cells to be suspended during incubation. The chamber should comprise a means for maintaining the inoculated cells in suspension, and a gas monitor and supply source to supply and maintain the proper gas concentrations. The incubation temperature should be in the range of from 30°C to about 45°C and is more preferably in the range of from about 36°C to about 38°C. Most preferably, the temperature is about 37°C. The necessary equipment for cultivation and attenuation is readily available to those of ordinary skill in the art given the teachings herein. One example of equipment suitable for carrying out the present invention is a dual gas incubator, e.g., model 480 (Lab-Line, Melrose Park, IL) in conjunction with spinner flasks to maintain the cells in suspension. The presently preferred equipment comprises a fermentor, bioreactor, stir plate or rotary shaker containing media and capable of maintaining the culture cells in

suspension via sparging gas of the appropriate concentration, or other means of mechanical agitation, and continuously monitoring dissolved O₂ levels in the media. New Brunswick, Braun and other companies make suitable fermentors and bioreactors for this purpose.

5

By maintaining the inoculated cells in a suspended state during incubation, maximum growth of the cells, and hence *L. intracellularis*, is achieved by increasing each individual cell's exposure to growth media and the proper mixture of hydrogen, oxygen and carbon dioxide. The culture cells can be agitated and maintained in suspension by a variety of methods known in the art including, for example, culture flasks, roller bottles, membrane cultures, biobags, WAVE™ bioreactor systems, and spinner flasks. The cells may be kept in suspension during incubation by incubating the cells in a spinner flask inside a dual gas incubator or similar apparatus. The term "spinner flask", as used herein, means a flask or other container which employs a paddles, propeller or other means to

10

15

Alternatively, the inoculated cells are incubated until the cells reach confluency and then the cells are placed in a spinner flask containing growth media and incubated in a dual gas incubator while spinning the flask. Preferably, the inoculated cells are scraped or trypsinized and passaged into the spinner flask. This can be achieved by a variety of methods known in the art such as using a cell scraper to detach the cells. Once the cells are introduced into the spinner flask, the paddle of the spinner flask is typically rotated in the range of from about 30 to about 60 rpm on a magnetic stir plate in order to maintain the infected cells in suspension.

20

25

A portion of the cultivated *L. intracellularis* is then passaged to fresh culture to increase the production of *L. intracellularis* bacteria. The term "passaging" or variations thereof herein means the process of transferring a portion of the cultivated *L. intracellularis* to fresh culture cells in order to infect the fresh cells with

30

23

the bacterium. The term "fresh", as used herein, means cells which have not yet been infected by *L. intracellularis*. Preferably such cells are on the average no more than approximately one day old.

5 The passage of *L. intracellularis* in suspension cultures may be accomplished by removing a portion of the original culture and adding it to a new flask containing fresh culture cells. If the original culture has a high number of bacteria/ml, for example, greater than about 10^4 bacteria/ml, it is preferable to add between about 1 to 10% (volume to volume) of culture from the infected flask to a new flask
10 containing fresh cells. This is preferably done when 50-100% of the cells are infected. If fewer than 50% of the cells are infected, passaging is preferably accomplished by splitting the culture 1:2 into a new flask and scaling-up the volume by adding fresh media. In either case, cell lysis and other steps are not required, in direct contrast to the passage of monolayer cultures, as in the prior art.

15

After sufficient growth of the culture cells and subsequent infection by *L. intracellularis*, as determined by indirect fluorescent antibody (IFA) staining, TCID₅₀ or another comparable method, at least a portion of the cultivated *L. intracellularis* bacteria is then harvested. The harvesting step may be performed
20 by separating the bacteria from the suspension by various techniques known to those of ordinary skill in the art, given the teachings herein. Preferably, the *L. intracellularis* bacteria is harvested by centrifuging the contents of all or a portion of the suspension to pellet the culture cells, resuspending the resulting cell pellets, and lysing the infected cells. Typically, at least a portion of the contents is
25 centrifuged at about 3000xg for about 20 minutes in order to pellet the cells and bacteria. The pellet may then be resuspended in, for example, a sucrose-phosphate-glutamate (SPG) solution and passed approximately 20 times through a 25 gauge needle in order to lyse the cells. If further purification is desired, the samples can be centrifuged at about 145xg for about five minutes to remove
30 cellular nuclei and debris. The supernatant may then be centrifuged at about 3000xg for about twenty minutes and the resulting pellet resuspended in an

24
24

- 7 -

appropriate diluent, such as SPG with fetal bovine serum (to prepare harvested bacteria suitable for lyophilization, freezing, or use as an inoculant) or growth media (to prepare harvested bacteria more suitable for passaging to fresh cells).

- 5 As previously mentioned, effective growth of *L. intracellularis* for large-scale production is enhanced by keeping the tissue cells actively growing. Using suspension cultures greatly facilitates keeping the cells actively growing and permits continuous culture expansion and scale-up. Using a fermentor and between about 0 to 3% dissolved O₂ as explained above, enables growth of up to
10 10⁸ bacteria/ml.

When using McCoys or IEC-18 cells, it is preferable to add gelatin, agarose, collagen, acrylamide or silica beads, such as Cultisphere-G porous microcarriers (HyClone Laboratories, Logan Utah), along with the growth media. However,
15 HEp-2 cells and others do not require microcarriers according to the methods used herein.

For culture maintenance purposes, with HEp-2 cultures, preferably 25% to 50% of the culture is removed and replaced with fresh media at weekly intervals. For cell
20 cultures with microcarriers or beads, preferably 25% to 50% of the culture is removed and replaced with fresh media 1-2 times weekly. For scale-up purposes, an additional 25% to 50% of media, or media with microcarriers, may be added to the culture.

25 Depending upon the rate at which the culture cells become infected, passage to fresh cells generally occurs between about every 2 to about 7 days. Assuming that the culture cells become at least 70% infected within 2 to 7 days, preferably passage occurs between about every 5 to 7 days.

30 Diagnosis of *L. intracellularis* antigen is carried out today by using direct immunofluorescence and PCR. Diagnosis of antibodies specific to *L. intracellularis* is

25

carried out today by using immuno-fluorescence. These methods are laborious and time consuming and are not suitable for large scale screenings.

Effective diagnosis of PPE has also been hindered by the time required to culture the causative bacteria. As a result of the present invention, development of diagnostic tools promoting rapid and accurate assays for the presence of *L. intracellularis* in biological samples taken from swine and other animals susceptible to PPE is now possible.

Therefore, the technical problem underlying the present invention is to provide improved methods for diagnosis of *L. intracellularis* disease.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of animal health and in particular to *Lawsonia intracellularis*. In particular, the invention relates to a method of diagnosing *Lawsonia intracellularis* infection and a diagnostic test kit using *Lawsonia intracellularis*-specific antibodies. The invention also relates to the use of the method or test kit for diagnosing *Lawsonia intracellularis* infections.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1: Results of Blocking ELISA according to the invention

Fig. 2: Results of 301 field sera compared in IFA and ELISA

Fig. 3: Results of Ileitis blocking ELISA - cross-sectional screenings in 3 farms

Fig. 4: Results of Ileitis ELISA- 22 German farms

Fig. 5: Correlation of ELISA results with clinical symptoms.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions of terms used in the description:

Before the embodiments of the present invention it must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example,

28
76

- 9 -

reference to "a bacterium" includes a plurality of such bacteria, reference to the "cell" is a reference to one or more cells and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated herein by reference for the purpose of describing and disclosing the cell lines, vectors, and methodologies as reported in the publications which might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

As used herein, the term "*L. intracellularis*" means the intracellular, curved gram-negative bacteria described in detail by C. Gebhart *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1993) and S. McOrist *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820-825 (1995), each of which is incorporated herein by reference in their entireties; the causative bacteria which can be obtained from PPE infected swine or other animals throughout the world given the knowledge in the art and the teachings herein; and variants or mutants of any of the above bacteria, whether spontaneously or artificially obtained and DNA, RNA and bacterial proteins specific for *L. intracellularis*, including proteins expressed in vectors or after *in vivo* application, and also fragments or antigenic derivatives of *L. intracellularis*. This term also includes adapted isolates and attenuated isolates as defined below.

As used herein, the term 'adapted isolate' means any *L. intracellularis* isolate that is prepared according to the cultivation and passaging techniques in cell culture or any other technique to replicate *L. intracellularis* for purposes of antigen preparation.

As used herein, the term "attenuated isolate" means any *L. intracellularis* isolate that is prepared according to the cultivation and passaging techniques taught herein to achieve avirulence while maintaining immunogenic properties when
5 administered to a host animal.

As used herein, the term "large-scale cultivation" means a level of cultivation of *L. intracellularis* greater than approximately 2.0 to 3.0 liters and includes production on a scale of 100 liters or more. "Cultivation" as used herein, means the process
10 of promoting the growth, reproduction and/or proliferation of *L. intracellularis*.

Disclosure of the invention

The solution to the above technical problem is achieved by the description and the embodiments characterized in the claims.

15

The aim of the present invention is to provide a method of diagnosing pre-clinical or clinical *L. intracellularis* infection. Furthermore, an immune response to *L. intracellularis* shall be detected and a tool for *L. intracellularis* epidemiology is to be provided.

20

This objective has been achieved according to the present invention within the scope of the specification and claims by means of a method of diagnosing pre-clinical or clinical *L. intracellularis* infection.

25 The invention relates to the detection of antibodies against *L. intracellularis* and to the detection of *L. intracellularis* itself. Such antibodies include any antibody type known to the skilled person, in particular immunoglobulins of the subtypes IgA, IgM, IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), and also IgD, IgE.

30 To detect antibodies specific for *L. intracellularis*, according to the invention, the method is based on the fact that

- a) a liquid sample is taken from a mammal
- b) the specific binding of such liquid sample to *L. intracellularis* antigen is detected
- 5 c) the result obtained is compared with a control.

As defined above, *L. intracellularis* also includes fragments or antigenic derivatives of *L. intracellularis*, which may be used in a method as above.

- 10 Similarly, according to the invention, to detect *L. intracellularis*, the method according to the invention is as follows:
the method is based on the fact that

- a) a liquid sample is taken from a mammal
- 15 b) the specific binding of such liquid sample to *L. intracellularis* antibodies is detected
- c) the result obtained is compared with a control.

The liquid sample may include any bodily fluid including saliva, sweat, urine,
20 blood, secretions, excretions or other bodily fluid samples known to the expert in the field. In a preferred embodiment, the liquid sample is collected using either a collection container (for urine or other liquid), a syringe/collection tube (for blood) or some type of collection swab (for saliva, sweat etc.) Preferably, if the sample in step a) is blood, serum or plasma is isolated from this blood sample and step b) is
25 carried out with serum or plasma instead of the liquid sample. Subsequently, step c) is carried out as above.

In a preferred embodiment, the method is an immune test. An immune test uses monoclonal antibodies or polyclonal antisera specific to *L. intracellularis*. Immune
30 tests according to the invention include the methods of detection known in the art such as the ELISA test (enzyme-linked immuno-sorbent assay) or the so-called

sandwich-ELISA test, dot blots, immunoblots, radioimmuno tests (radioimmunoassay RIA), diffusion-based Ouchterlony test or rocket immunofluorescent assays. Other immune tests are the indirect or direct immunofluorescent antibody test ("IFA"). Another immune test is the so-called

5 Western blot (also known as Western transfer procedure or Western blotting). The purpose of Western blot is to transfer proteins or polypeptides separated by polyacrylamide gel electrophoresis onto a nitrocellulose filter or other suitable carrier and at the same time retain the relative positions of the proteins or polypeptides obtained from the gel electrophoresis. The Western blot is then

10 incubated with an antibody which specifically binds to the protein or polypeptide under consideration. These methods of detection can be used by the average skilled person to perform the invention described herein. Literary references in which the skilled person can find the above-mentioned methods and other detection methods are listed as follows: *An Introduction to Radioimmunoassay and*

15 *Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock *et al.*, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands

20 (1985). Solid and fluid protein chip technologies or microarray technologies using labeled or unlabeled reagents are further immune tests according to the invention. Such test are widely described, for example by Kozak KR, *et al.*, *Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis*..Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct

25 14;100(21):12343-8 (2003), or by Fulton, R.J., *et al.*, *Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrixTM system*. Clinical Chemistry 43 (9), 1749-1756 (1997).

The invention further relates to a diagnostic test kit for detecting *L. intracellularis*

30 infection which contains all the elements required to carry out a method of diagnosing pre-clinical or clinical *L. intracellularis* infection as described herein.

30
30

- 13 -

The invention further relates, in particular, to a diagnostic test kit which contains antibodies specific to *L. intracellularis*.

- 5 The invention further relates, in particular, to a diagnostic test kit, characterised in that the antibodies according to the invention are polyclonal.

The invention further relates, in particular to a diagnostic test kit, characterised in that the antibodies according to the invention are monoclonal.

10

A diagnostic test kit is a collection of all the components for a method of diagnosis according to the invention. Some examples (not an exhaustive list) of other elements for performing a process according to the invention include containers such as 96-well plates or microtitre plates, test tubes, other suitable containers, surfaces and substrates, membranes such as nitrocellulose filter, washing reagents and buffers. A diagnostic test kit may also contain reagents which may detect bound antibodies, such as for example labelled secondary antibodies, chromophores, enzymes (e.g. conjugated with antibodies) and the substrates thereof or other substances which are capable of binding antibodies.

20

The *L. intracellularis* bacteria as disclosed herein or known in the art, or components derived from such bacteria, can be used as an antigen in an ELISA or other immunoassay, such as an immunofluorescent antibody test ("IFA"), to detect antibodies to *L. intracellularis* in the serum and other body fluids of animals suspected of being infected with the bacteria. The presently preferred immunoassay is an IFA as described in the example below. Alternatively, the bacteria of the instant invention can be used in a Western Blot assay.

25

The preferred Western Blot protocol is as follows:

30

21
31

- 14 -

1. Run antigen on SDS-PAGE, preferably on 12% SDS-PAGE, and transfer to nitrocellulose membrane.
2. Place membrane in blocking buffer for 2 hours.
3. Remove blocking buffer and rinse with PBS for 1 minute.
- 5 4. Dilute serum in blocking buffer and add to membrane. Incubate for 2 hours at room temperature.
5. Wash 3 times with wash buffer (5 minutes for each wash).
6. Dilute a conjugated anti-*L.intracellularis* specific antibody, preferably a monoclonal antibody, in blocking buffer and add to membrane. Incubate for
- 10 1 hour at room temperature.
7. Wash 3 times with wash buffer.
8. Add substrate for 10 minutes or until strong banding occurs.
9. Rinse with PBS.
10. Air dry and store in the dark.

15

The conjugate linked to the antibody could be for example an enzyme, such as a horse radish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP). Alternatively, a chromophore, or any other detectable substance which is can be quantified in the presence of a substrate, can be used as conjugate.

20

The most preferred immune test according to the invention is an ELISA. Most preferably, such ELISA is a sandwich ELISA (= capture ELISA). Such an ELISA is more specific, as it detects with two antibodies specific to two different epitopes on the same antigen. In a sandwich ELISA, unlabelled antibodies are coated to the

25 microtiter plates. The *L. intracellularis* as antigen is subsequently added. After a washing step, the bound *L. intracellularis* antigen is detected with a second, labeled, *L. intracellularis*-specific antibody reactive to a different epitope on *L. intracellularis*.

30 An exemplary coating procedure is as follows:

32
32

- 15 -

The plates are coated with unlabelled antibody, e.g. in 10% Sucrose/10% Normal Horse Serum in ddH₂O and incubated with *Lawsonia intracellularis* antigen. The plates are then dried and sealed and stored at 37°C. Alternatively, the antibody coated plates are stored and the antigen is added when the ELISA is conducted.

5

A preferred ELISA protocol according to the invention is as follows (use of antibody coated plates):

- 10 1. Add 0.1 ml/well antigen diluted in coating buffer. Incubate for 18 hours at 4°C.
2. Wash 3 times with PBS.
3. Add 0.25 ml of blocking buffer to each well of plate. Incubate 1 to 2 hours at 37°C.
4. Wash 3 times with wash buffer.
- 15 5. Dilute serum in blocking buffer and add 0.1 ml to the first wells of plate. Make serial 1:2 dilutions across the plate. Incubate for 1 hour at 37.
6. Wash 3 to 5 times with wash buffer.
7. Dilute a conjugated anti-*L.intracellularis* specific antibody, preferably a monoclonal antibody, in blocking buffer and add 0.1 ml to wells of plate and
- 20 incubate for 1 hour at 37°C.
8. Wash 3 to 5 times with wash buffer.
9. Add substrate.
10. Measure absorbance of light with a spectrophotometer.
11. Wells in which antigen was not added are used as blanks.
- 25 12. Positive and negative control swine serum should also be used with each test.

A preferred ELISA is carried out as follows:

23
33

- 16 -

The plates are coated with unlabelled antibody, e.g. in 10% Sucrose/10% Normal Horse Serum in ddH₂O and incubated with *Lawsonia intracellularis* antigen. The plates are then dried and sealed and stored at 37°C.

- 5 1. Add 90µl buffer into all wells.
2. Add 10 µl serum into selected wells.
3. Incubate plate for 1 hour at 37C.
4. Wash plate 3 times with PBST.
5. Add HRP conjugated anti-L.intracellularis specific antibody, preferably a
- 10 monoclonal antibody diluted in CDS-C+0.5M NaCl, 100µl /well.
6. Incubate plate for 1 hour at 37C.
7. Wash plate 3 times with PBST.
8. Add substrate, 100µl/well and incubate at room temperature for 10 minutes.
9. Add 50µl stop/well.
- 15 10. Read the plate at 450 nm in a spectrophotometer.

The most preferred sandwich ELISA protocol according to the invention is as follows:

- 20 1. Add 0.1 ml/well mAb diluted in coating buffer. Incubate for 18 hours at 4°C.
2. Wash 3 times with PBS.
3. Add 0.1 ml/well antigen diluted in buffer to each well of plate. Incubate 1 to
- 2 hours at 37°C.
4. Wash 3 times with wash buffer and/or directly add 0.25 ml of blocking buffer
- 25 to each well of plate. Incubate 1 to 2 hours at 37°C.
5. Wash 3 times with wash buffer.
6. Dilute serum in blocking buffer and add 0.1 ml to the first wells of plate.
- Make serial 1:2 dilutions across the plate. Incubate for 1 hour at 37.
7. Wash 3 to 5 times with wash buffer.

8. Dilute conjugated anti-*L. intracellularis* specific antibody, preferably a monoclonal antibody in blocking buffer and add 0.1 ml to wells of plate and incubate for 1 hour at 37°C.
9. Wash 3 to 5 times with wash buffer.
- 5 10. Add substrate.
11. Measure absorbance of light with a spectrophotometer.
12. Wells in which antigen was not added are used as blanks.
13. Positive and negative control swine serum should also be used with each test.

10

Antigen as used herein is *L. intracellularis* as defined above. mAb relates to a monoclonal antibody specific for *L. intracellularis*. Preferably, such antibody is an antibody as disclosed below.

- 15 Surprisingly, outstanding antibodies were generated to be used in the ELISA according to the invention. The antibodies have the following reference numbers: 301:39, 287:6, 268:29, 110:9, 113:2 and 268:18. All antibodies are specific for antigens of *L. intracellularis* bacteria. Preferably as capture antibodies in a sandwich ELISA are 110:9, 113:2 or 287:6, and as conjugated antibodies 268:18,
- 20 268:29 or 287:6. Most preferred as capture antibody is antibody 110:9 and as conjugated antibody is antibody 268:29. Also preferred are antibodies having all of characteristics of such antibodies mentioned above, which means having nearly the same binding characteristics of the antibodies mentioned above, and/or which are directed to the same antigens of *Lawsonia intracellularis* as compared to the
- 25 antibodies mentioned above, and/or are directed to or identifying the same epitopes as compared to those antibodies mentioned above.

The antibodies according to the invention are produced by hybridoma cells. Said hybridoma cells according to the invention are deposited at the Centre for Applied

30 Microbiology and Research (CAMR) and European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK, as patent deposit according to the

35

Budapest Treaty. The date of deposit was May 11, 2004. HYBRIDOMA CELL LINE 110:9 is successfully deposited under ECACC Acc. No. 04092204. HYBRIDOMA CELL LINE 113:2 is successfully deposited under ECACC Acc. No. 04092201. HYBRIDOMA CELL LINE 268:18 is successfully deposited under
5 ECACC Acc. No. 04092202. HYBRIDOMA CELL LINE 268:29 is successfully deposited under ECACC Acc. No. 04092206. HYBRIDOMA CELL LINE 287:6 is successfully deposited under ECACC Acc. No. 04092203. HYBRIDOMA CELL LINE 301:39 is successfully deposited under ECACC Acc. No. 04092205.



The present invention is further described in the following examples which are provided for illustrative purposes only and are not to be construed as limiting. Indeed, other variants of the invention will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

All publications and patents cited herein are incorporated by reference in their entireties.

10 **EXAMPLES**

EXAMPLE 1

1.0 Material

anti-Lawsonia hybridomal celline : 372:13, 113:2, 268:18, 287:6, 110:9, 268:29,
15 301:39.

Equipment and media for hybridomal cell cultivation.

Equipment and buffers for purification and HRP conjugation of monoclonal antibodies (mAb).

Equipment and solutions for ELISA

20 Lawsonia antigen SF 1289 N343 12/20/00

Lawsonia positive sera: lot#052902pig#26 (experimentally infected),

lot#052902pig#69 (vaccinate)

Lawsonia negative sera: p 25.8#273 Day 52 6-30-95,

116705

25

1.1 Methods

The preparation of the monoclonal antibodies was performed according to standard operating procedures at Svanova Biotech.

30 *1.1.1 Culturing of hybridomal cells and preparation of HRP conjugated monoclonal antibodies*

- To secure the hybridomal cell-lines 15 vials of each cell line was prepared and stored in -135°C.
- One vial of each hybridomal cell-line was thawed and the cells were grown in cell-culture flasks.
- 5 • 500ml to 1000 ml of supernatant from each cell line was purified and conjugated to horse-radish peroxidase.

1.1.2 Blocking ELISA

The purified and HRP conjugated mAb's were tested for their ability to be blocked
10 by positive Lawsonia pig sera in ELISA.

- The ELISA plate was coated with Lawsonia antigen in a dilution of 1/200, 100µl/well
- The pig sera was diluted 1/10, 100µl/well
- The HRP conjugated mAb's were diluted and added, 100µl/well.

15

The results are expressed as Percent inhibition (PI) according to the following formulae:

$$PI = 1 - (OD \text{ sample} / OD \text{ mAb}) \times 100.$$

20 1.2 Results

1.2.1 Culturing of hybridoma cells and preparation of HRP conjugated monoclonal antibodies

- All but one of the mAb's were successfully purified and HRP conjugated. They had good production capacity.
- 25 • mAb 372:13 had poor production capacity. This mAb was not successfully HRP conjugated and was therefore not tested in the blocking ELISA.

1.2.2 Blocking ELISA

- Two positive (#26, #69) and two negative (25.8#273, 116705) sera were used in
30 the experiments.

38

- The experimentally infected sera (#26) inhibited all the six HRP conjugated mAb's, but in different levels. The sera from a vaccinated pig inhibited the mAb's to a much lesser extent.
- The negative sera showed no or very low inhibition.

5

The results are presented in the table below and in Fig. 1.

Serum	mAb					
	301:39	110:9	268:29	287:6	113:2	268:18
#26 exp						
+	57	45	78	74	42	72
#69vacc						
+	18	23	52	43	45	25
25.8#273						
-	7	3	27	20	14	21
116705						
-	-7	-9	-24	-13	18	-19

10 1.3 Discussion

The results of this study clearly show that one ore more of the monoclonal antibodies tested are suited for a blocking ELISA test against *Lawsonia intracellularis*. MAb 268:29, 287:6 and 268:18 show the clearest distinction between the positive and negative sera i.e. are strong candidates in the

15 development of the blocking ELISA.

EXAMPLE 2

2.0 Summary

- 20 Development and establishment of a sandwich b-ELISA prototype for the detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis*:

29

- 22 -

After calculation of sensitivity and specificity by using immunofluorescence test IFA as gold standard the following can be concluded:

- Capture mAb 110:9 gives a clear distinction between positive and negative samples.
- 5 • Detection mAb 268:29 HRP gives a clear distinction between positive and negative sera showing a sensitivity and specificity of 100%.
- It is recommended that the prototype will be as follows:
- mAb 110:9 as capture mAb, coated in Nunc maxi-sorp strips C-8
- 10 • Antigen(Ag): *Lawsonia intracellularis* culture (preferably the concentrated material produced in R&D at BI)
- Serum samples diluted 1/10 in 0.5M NaCl/PBST. Incubation for 1 hour at 37C.
- HRP conjugated mAb 268:29 , lyophilized in CDS-C buffer containing 0.5M NaCl. Incubation for 1 hour at 37C.
- 15 • Substrate K-Blue Max, incubation for 10 minutes at room temperature.
- Svanova's stop solution

2.1 Material and methods

The ELISA was performed according to the following procedure:

20

2.1.0 ELISA procedure

- Add 90µl buffer into all wells.
- Add 10 µl serum into selected wells.
- Incubate plate for 1 hour at 37C.
- 25 • Wash plate 3 times with PBST
- Add HRP conjugate mAb diluted in CDS-C+0.5M NaCl, 100µl /well.
- Incubate plate for 1 hour at 37C.
- Wash plate 3 times with PBST.
- Add substrate, 100µl/well and incubate at room temperature for 10 minutes.
- 30 • Add 50µl stop/well

40
110

- 23 -

- Read the plate at 450 nm in a spectrophotometer.

The results were presented as 1- OD values or 2- PI (percent inhibition) values i.e.
100 – sample OD/ mAb OD x 100.

5

2.1.1 Test 1 (ELISA 030922, 030923 x2)

C-8 maxi strips coated with mAb 110:9, 113:2, 301:39, 287:6, 268:29, 300ng/well

Blocking of strips with 10% 2251HÄS(normal horse serum), 10% sucrose/UHP
H₂O. 150µl/well, incubated for 30 seconds at room temperature.

10 Ag # 030619 diluted 1/10 in PBST, 100µl/well, 3hours incubation in 4C.

Strips dried in 37C for 3 hours. Kept in 4C.

Sera: IFA pos: #26, #69. IFA neg: #6, C1, D1, E1. Diluted 1/10 in 0.5M NaCl/PBST

15 Conjugate: 268:18, 113:2, 301:39, 110:9, 287:6, 268:29 HRP diluted in 0.5M
NaCl/PBST.

All capture mAb's were tested against all HRP conjugated mAb except against its
own.

2.1.2 Test 2 (ELISA 030924)

20 Strips coated with 110:9, 113:2 and 287:6 according to test 1 above.

Sera: IFA pos: #26, #69. IFA neg: #6, C1, D1, E1. Diluted 1/10 in 0.5M NaCl/PBST

HRP Conjugate mAb 268:18, 268:29, 287:6 diluted in 0.5M NaCl/CDS-C
(standard buffer for lyophilizing of conjugates as Svanova in production).

25 2.1.3 Test 3 (ELISA 030925)

Strips coated with 110:9, 113:2 and 287:6 according to test 1 above.

Sera: 24 sera (10 IFA pos, 10 IFA neg and 4 doubtful) were tested.. Dilution: 1/10
in 0.5M NaCl/PBST.

Conjugate: 268:18 HRP diluted in 0.5M NaCl/CDS-C.

30

2.1.4 Test 4 (ELISA 030930, 031002, 031008)

41

- 24 -

Strips coated with 110:9 according to test 1 above.

Sera: 21 IFA positive and 69 IFA negative . Dilution: 1/10 in 0.5M NaCl/PBST

Conjugate: 268:18 conjugated with HRP and 268:29 conjugated with HRP diluted in 0.5M NaCl/CDS-C.

5

2.2 Results

2.2.1 Test 1 (ELISA 030922, 030923 x2)

10 . Capture mAb 110:9, 113:2 and 287:6 with conjugates 268:18 and 268:29 and 287:6 seems to be the best candidates for the sandwich b-ELISA as these combinations showed the best blocking capacity on the positive sera. Sera no #6 scored positive in most of the tests. This was suspected as this sera also scored positive in the previously developed b-ELISA prototype.

2.2.2 Test 2 (ELISA 030924)

15 This test was mainly performed to assure that the standard buffer used to lyophilizing of the conjugate could be used. The results show that blocking was achieved with the positive sera. The best blocking was found with detection mAb 268:18 or 268:29.

20 2.2.3 Test 3 (ELISA 030925)

The capture mAb 110:9 was found to be the best choice as it gave the clearest differentiation between positive and negative samples.

2.2.4 Test 4 (ELISA 030930, 031002, 031008)

25 Obtained OD and PI values can be found in appendix 5. When plotting the OD values against the IFA results HRP conjugated mAb 268:29 gives the clearest distinction between positive and negative samples with a 100 % sensitivity and specificity. mAb 268:18 also gives a sensitivity and specificity of 100% but the area between positive and negative samples is slight. When plotting the PI values mAb
30 268:18 gives a sensitivity of 95.7 and specificity of 100% at cut-off 20.9 while mAb 268:29 gives both a sensitivity and specificity of 100% at cut-off 28.6

42
42

- 25 -

2.3. Discussion

After calculation of sensitivity and specificity against the immunofluorescence test IFA the following can be concluded:

- 5 • Capture mAb 110:9 is the best choice as it gives a clear distinction between positive and negative samples.
- Detection mAb 268:29 conjugated with HRP is the best choice as it gives a clear distinction between positive and negative sera with a sensitivity and specificity of 100%.

10

It is recommended that the prototype will be as follows:

- mAb 110:9 as capture mAb, coated in Nunc maxi-sorp strips C-8.
- Ag: *Lawsonia intracellularis* culture (preferably the concentrated material
15 produced in R&D at BI)
- Serum samples diluted 1/10 in 0.5M NaCl/PBST. Incubation for 1 hour at 37C.
- HRP conjugated mAb 268:29, lyophilized in CDS-C buffer containing 0.5M NaCl. Incubation for 1 hour at 37C.
- Substrate K-Blue Max, incubation for 10 minutes at room temperature.
- 20 • Svanova's stop solution

EXAMPLE 3

3.1 Summary

- 25 The performed accelerated stability studies indicate that the *Lawsonia intracellularis* antigen captured ELISA plate has a stability of at least one year and that the a- *Lawsonia* HRP conjugate 268:29 has a stability of 6 to 12 months in a lyophilized form.

30 3.2 Introduction

43
43

- 26 -

In order to estimate the stability of the components of a future Lawsonia intracellularis ELISA kit accelerated stability tests has to be performed. The component to be tested is stored at 37C for 4 weeks and is thereafter tested in the ELISA in comparison with a component kept at 4C. 4 weeks stability in 37C indicates a shelf-life of about 12 months. This report describes accelerated stability studies performed on the antigen captured ELISA plate and on the HRP conjugate.

3.3 Materials and methods

10 Accelerated stability on plates (ELISA 031024)

Plates were coated with Lawsonia mAb 110:9 blocked with 10% Sucrose /10% Normal Horse serum in ddH₂O and incubated with Lawsonia antigen. Plates were dried and sealed and put in +37°C. Plates were taken from +37C weeks 1, 2, 3 and 4 and stored in a refrigerator. Plates were also stored in +4C for the whole test-period as a reference.

Positive sera #26, #69 and #06 and negative C2, D1 and E2 were used to check the performance of the sandwich ELISA.

HRP conjugated mAb 268:29 lot #030120 was used.

20 Accelerated stability on lyophilized conjugate (ELISA 031027)

HRP conjugated mAb 268:29 lot #030120 was diluted 1/1000 in CDS-C buffer dispensed into glass bottles and lyophilized according to standard procedures. Four lyophilized bottles were stored at +37C for 1, 2, 3 and 4 weeks. Bottles were also stored at 4C. The different bottles were tested in the sandwich ELISA.

25 As positive serum #26 was used and negative serum 030926 were used.

It was found that a dilution of 1/1000 of the conjugated antibody ("conjugate dilution") gave too high OD values in the test. The conjugated antibody was therefore titrated in the plate to obtain a correct signal for the test.

30 3.4. Results

Accelerated stability on plates

44
44

- 27 -

A big drop in OD values were seen after week 1 compared to the OD value from the strips kept in +4°C. No big differences were seen when comparing week 1 to 4.

When looking at the PI values no significant was found between week 1 through 4
5 and +4°C.

Accelerated stability on lyophilized conjugate

At a "conjugate dilution" of 1/8000 serum # 26 showed a decrease from 0.547 to 0.398 after 4 weeks and serum 030926 dropped from 1,654 to 0.99 after the 4
10 week period.

3.5. Discussion

The performed accelerated stability studies indicate that the *Lawsonia intracellularis* ELISA plate has a stability of at least one year. The anti-*Lawsonia*
15 HRP conjugated 268:29 antibody showed a 40% decrease in OD value against the negative sera and after 4 weeks. This might indicate some instability of the conjugate. When calculating on the OD values a 40% decrease of a signal at 1.5 means and OD value of 0.9 after 1 year which is still within the acceptance criteria.

20

EXAMPLE 4

4.1. Summary

The verification of the prototype (plate batch 040107) was performed by testing 50 sera previously used when developing the prototype. The verification study
25 showed a 100% agreement with the positive sera while 2 of the 25 negative sera scored positive in the verified batch.

It was found that normal horse serum can be used in the CDS-C buffer instead of swine sera which is the case today.

30

45
45

- 28 -

It was found that PBST containing 0.042% PVP showed similar results as using the PBST tablets (that contains PVP).

4.2. Introduction

- 5 In order to verify the sandwich ELISA prototype a larger number of sera have to be tested on a large scale produced plate batch. The study was performed on plate batch 040107 that was tested by examining 50 serum samples that had previously been used to develop the prototype.
- 10 Buffer CDS-C is used as preservative when lyophilizing the HRP conjugate. This buffer contains swine sera. As it can be problematic in the future to find Lawsonia negative sera to be used in the CDS-C buffer an alternative has to be tested. In this study normal horse serum and foetal bovine serum were tested.
- 15 The majority of the laboratory work on this ELISA has been performed with PBST tablets. It has been seen that the 20x conc. PBST that is included in Svanovir kits can not be used since the test will then not correctly differentiate between positive and negative samples. When comparing the recipes of the tablets and the 20x conc. PBST it was found that all components were the same except for 0.042%
- 20 PVP (Polyvinylpyrrolidone K25) that was included in the tablets as a stabilizing factor. Experiments showed that when adding the PVP to the 20x PBST the same results as the tablets will be achieved.

4.3. Materials and methods

- 25 Verification of prototype (ELISA 040312)
50 sera (received from Bioscreen) previously tested in the prototype ELISA was tested on the large scale plate batch # 040107. PBST 20x conc buffer with 0.042% PVP was used. Lyophilized conjugate batch 040308 was used.
- 30 CDS-C buffer with normal horse serum
Test ELISA 040203

46

- 29 -

CDS-C buffer was prepared with; 1- swine serum (as in TJ4/05F), 2- with normal horse serum and 3- with foetal bovine serum. The buffers were tested as conjugate buffer in the ELISA. Serum tested were gris 2, 4, 13 and 17, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239, #26 and C2. HRP conjugated mAb 268:29 lot #030318 was used. 20 x conc PBST with 0.042% PVP was used

Test ELISA 040311

CDS-C buffer containing normal horse serum has been used to prepare lyophilized conjugate at two occasions (040211, 040308). The conjugate was prepared to obtain a final dilution of 1/20k, 1/25k and 1/30k. Freshly prepared conjugate was tested in parallel. Serum #26, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239, pos pool 030926 and neg pool 030926 were used. HRP conjugated mAb 268:29 lot #030318 was used. 20 x conc PBST with 0.042% PVP was used.

15 PBST with PVP (ELISA 040301)

PBST buffer 20x concentrated was diluted 1/20 and a final concentration of 0.042% PVP was added. This buffer was tested in parallel with PBST tablets (already containing PVP) and 20x conc PBST buffer diluted 1/20. The buffers were used in all steps, i.e. in the sample and conjugate dilution buffer as well as in the washing buffer.

Serum #26, E1, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239 and gris 13 were used. HRP conjugated mAb 268:29 lot #030318 was used. As conjugate buffer CDS-C with swine serum was used.

25 4.4. Results

Verification of prototype

The results show that all 25 previously positive sera also scored positive in the verification batch. Two out of the 25 previously negative sera scored positive.

30 CDS-C buffer with normal horse serum

47

- 30 -

The buffer containing normal horse serum showed similar results as the one with swine sera.

5 The reading of the lyophilized HRP conjugated mAb decreased at the most 0.4 OD when compared to the freshly prepared conjugate. This drop was noticed in both batches of lyophilized conjugate. It is not affecting the test performance as the calculated PI values corresponded well regardless of obtained OD values.

PBST with PVP

10 The results show that 20x concentrated PBST solution diluted 1/20 with addition of 0.042% PVP gave similar results as the PBST tablets while 20x conc PBST diluted 1/20 without the PVP showed false negative results.

4.5. Discussion

15 The verification of the prototype (plate batch 040107) was performed by testing 50 sera previously used when developing the prototype. The verification study showed a 100% agreement with the positive sera while 2 of the 25 negative sera scored positive in the verified batch. The "false" negative results are acceptable as the major importance of this test is to detect positive samples. It has also not been
20 proven that the results from the previous testing are indeed true.

It was found that PBST containing 0.042% PVP showed similar results as using the PBST tablets (that contains PVP). The future kits will therefore contain this buffer. A stability study of the PBST 20x conc with PVP has to be performed to
25 ensure the validity of the kits.

EXAMPLE 5

5.1 Introduction and Objectives

Detection of serum antibodies against *Lawsonia intracellularis* so far is done by
30 the use of IFA tests (1). These tests rely on an individual and highly subjective judgment in interpretation of results. Recently a sandwich blocking ELISA was

developed using highly specific monoclonal antibodies against *L. intracellularis*. The data from this test can be measured and evaluated on an objective basis, which improves reproducibility, repeatability and comparative analyses. In this study first comparative data to the IFA test are presented, demonstrating the suitability and performance of the new test.

5.2 Material and Methods

L. intracellularis antigen grown on a McCoy cell culture and captured by a specific monoclonal antibody on microtiter plates was used to detect antibodies against *L. intracellularis* in porcine serum samples. Sera were tested in a 1 to 10 dilution. After 1 h of incubation at 37 °C plates were washed with PBS Tween solution, horseradish-peroxidase labeled monoclonal antibody (different to the capture antibody) was added. The plates were incubated for an additional hour at 37 °C. Unbound antibodies were removed by washing. After incubation with TMB substrate for 10 min at room temperature the reaction was stopped by adding a stop solution. The OD₄₅₀ was read in a photometer for each well. Results were calculated as percent inhibition of controls without serum.

301 field sera, tested in a validated IFA test (2) for antibodies against *L. intracellularis*, were used to evaluate the new ELISA. In addition cross-sectional samples (10 samples each from 9 age groups) from two farms with known ileitis and one farm with suspected ileitis were used to demonstrate the diagnostic value of the ELISA in comparison to the IFA.

5.3 Results

Many negative sera resulted in negative inhibition values. Therefore the lowest measured value was set to 0 and all other values were related to this. These data are declared as "relative ELISA values".

Results from the 301 field sera are summarized in Figure 2. The ELISA clearly discriminates between negative (mean relative ELISA value 36) and positive sera

(mean relative ELISA value 89). Majority of the samples that scored doubtful in the IFA were positive in the ELISA.

Results from the cross-sectional screenings in the 3 farms are shown in Figure 3. Both tests clearly detect antibodies against *L. intracellularis* in the 3 farms.

5

5.4 Discussion

In comparison to the IFA test results the ELISA provides a higher sensitivity. In some groups of the 3 tested farms the result from the ELISA is much more unambiguous than in the IFA test, that gave a lot of questionable results, due to
10 unspecific fluorescence. The serological profiles in the 3 herds corresponded well to previously published data from European herds (3,4). The increase of ELISA values between the group of 10 and 16 weeks old pigs in comparison to the IFA test results indicate, that sera with relative ELISA values greater 55 can be judged as positive.

15 This new test could help to improve diagnosis of Ileitis in routine samples. The new blocking Ileitis ELISA provides a tool for fast and sensitive screening of large amounts of samples on an objective basis.

References

- 20 1. Guedes RMC et al., 2002. Can J Vet Res 66:99-107.
2. Knittel JP et al., 1998. AJVR 59:722-726.
3. Biksi I et al., 2002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, USA
4. van Aken N et al., 2002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, USA.

25

EXAMPLE 6

6.1 Introduction and Objectives

Specific diagnosis of Ileitis so far is done by the use of IFA tests for antibody detection (1,2) or PCR (3,4), histological and immuno-staining methods (2,5,6) for
30 antigen detection in feces or intestinal tissue samples. All these methods have specific disadvantages concerning specificity, contamination risk or workload and

are not suitable for routine herd screenings on a large scale. So most diagnostic tests are done only for few pigs from a herd. By the use of a recently developed blocking ELISA serological testing becomes easier, more reliable and suitable for herd profiling. Cross-sectional screenings of 22 farms in Germany were performed
5 to demonstrate the diagnostic performance of the new test.

6.2 Material and Methods

Cross-sectional samples from twenty-two German farms were tested in the ELISA. From gilts, sows and pigs 4, 7, 10, 13, 16, 20 and 24 weeks of age samples were
10 taken on each farm (10 samples in each age group). The ELISA was done as described in example 5.

6.3 Results

In Figure 4 the mean relative ELISA values from all 22 farms are summarized.
15 Sera from gilts and sows are highly reactive in the ELISA, whereas results from flatdeck piglets of 4 to 10 weeks of age are low. In the fatteners ELISA values increase from 13 to 24 weeks.

In Figure 5 mean relative ELISA values are correlated with the clinical symptoms
20 in the farms. The farms No. 5, 6 and 15 had no clinical enteric problems at the time of sampling. In farm No. 3 piglets from 4 to 13 weeks had enteric problems, that were diagnosed as *E. coli* diarrhea. In farm No. 18 prior serological tests indicated the presence of *Lawsonia intracellularis* in the farm without clinical symptoms. In the farms No. 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 21 and 22 Ileitis was
25 diagnosed before sampling for this study. The farms No. 4, 13, 14, 16 and 20 report enteric problems in growers and fatteners, farms No. 4 and 13 with clinical suspected Ileitis. In farm No. 17 no clinical signs of diarrhea are observed, but antibiotics are used in growers and at the beginning of fattening.

87
51

6.4 Discussion

The summarized seroprofile from the 22 farms shows high reactivity in sows and gilts and rising antibody reaction starting at 13 weeks up to 24 weeks. These findings are in agreement with serological data published so far for Ileitis (7,8,9).

- 5 Pigs from the farms without diarrhea (No. 5, 6, 15 and 18) and the farm with *E. coli* diarrhea (No. 3) showed no significant seroconversion in the ELISA. In the farms with known Ileitis (No. 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 21 and 22) a clear seroconversion can be detected between week 7 and 13.

10 Interestingly the samples from most of the sow and gilt groups are highly reactive in the ELISA, although most of these pigs have no apparent enteric problems. This might be due to a subclinical infection with *Lawsonia intracellularis*. Results from farm No. 17 seem to indicate a subclinical Ileitis.

The new ELISA according to the invention provides a powerful tool for serological diagnosis of Ileitis suitable for routine testing of large sample sizes and cross-
15 sectional herd screenings.

References

1. Knittel JP et al., 1998. AJVR 59:722-726.
2. Guedes RMC et al., 2002. Can J Vet Res 66:99-107.
- 20 3. Jones GF et al., 1993. J Clin Microbiol 31: 2611-2615.
4. Suh-DK et al., 2000. J Vet Sci 1:33-37.
5. McOrist S et al., 1989. Vet Pathol 26: 260-264.
6. Huerta B et al., 2003. J Comp Path 129: 179-185.
7. Biksi I et al., 2002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, USA
- 25 8. van Aken N et al., 2002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, USA
9. Holyoake PK et al., 1994. J Clin Microbiol 32: 1980-1985.

52
52**CLAIMS:**

1. Method for the diagnosis of pre-clinical or clinical *Lawsonia intracellularis* infection, comprising the following steps:
 - 5 a) a liquid sample is taken from a mammal
 - b) the specific binding of such liquid sample to *L. intracellularis* is detected
 - c) the result obtained is compared with a control.
2. Method according to claim 1, wherein such method is an immune test.
- 10 3. Method according to claim 1 or 2, wherein such method is an ELISA.
4. Method according to any one of claim 1 to 3, wherein such method is a blocking ELISA.
- 15 5. Method according to any one of claim 1 to 4, wherein one or several monoclonal antibodies selected from the group consisting of:
antibody 301:39, antibody 287:6, antibody 268:29, antibody 110:9, antibody 113:2 and antibody 268:18 are used.
- 20 6. Hybridoma cell line ECACC Accession No. 04092204 secreting antibody 110:9
7. Hybridoma cell line ECACC Accession No. 04092201 secreting antibody 113:2
- 25 8. Hybridoma cell line ECACC Accession No. 04092202 secreting antibody 268:18
9. Hybridoma cell line ECACC Accession No. 04092206 secreting antibody 268:29
10. Hybridoma cell line ECACC Accession No. 04092203 secreting antibody 287:3

54
54

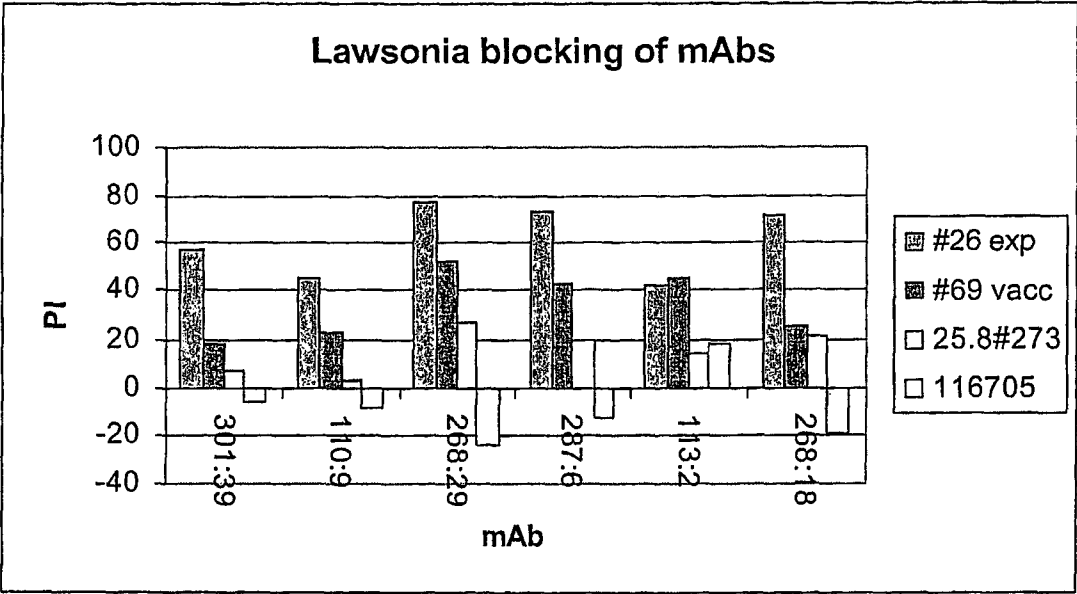


Fig. 1

88
55

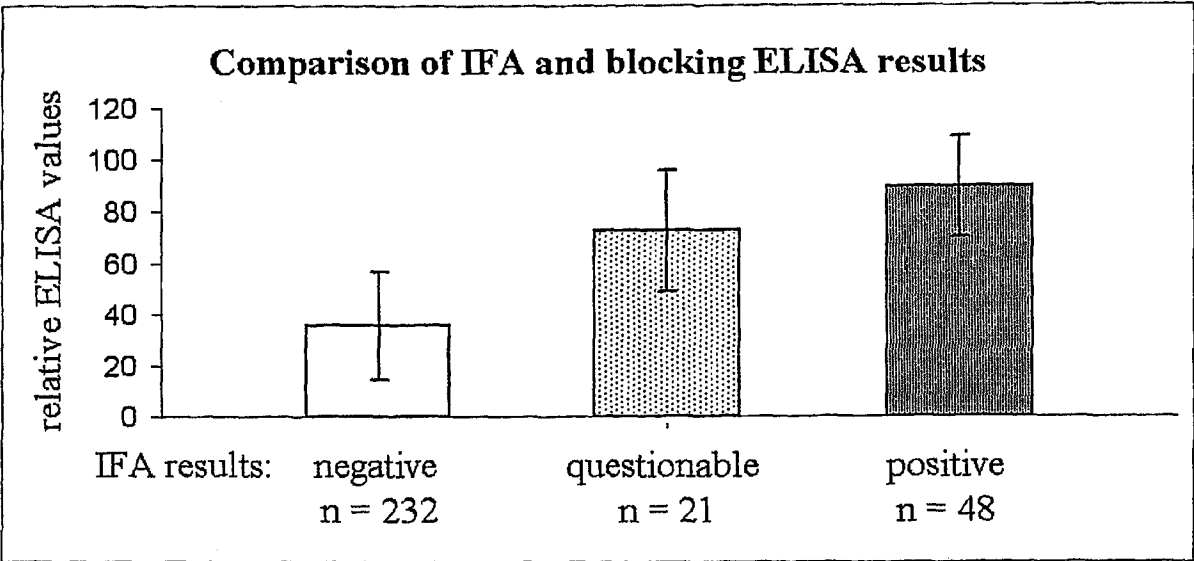
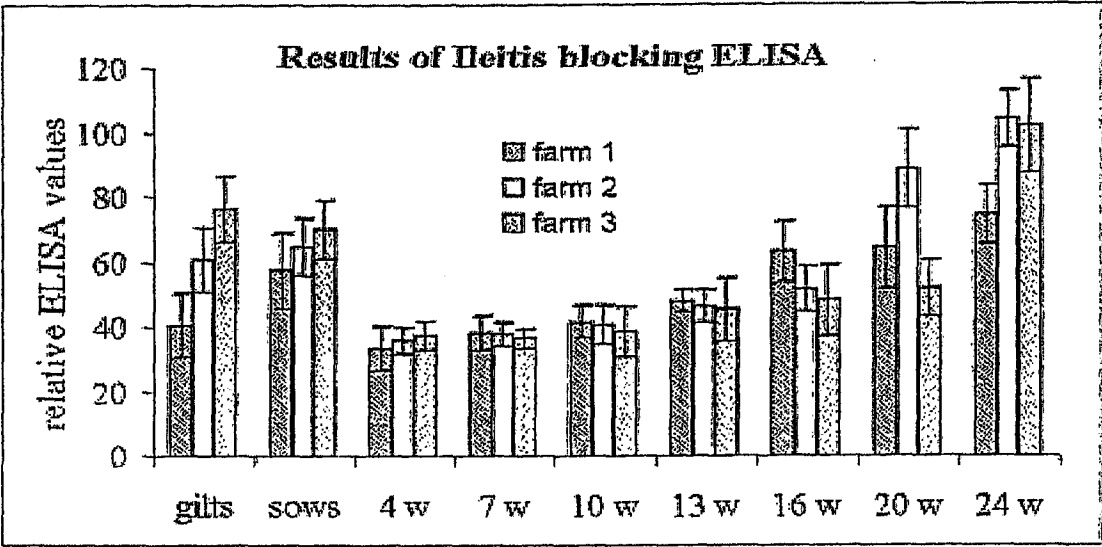


Fig. 2

86
56



IFA test results	farm 1	farm 2	farm 3
gilts	0 / 0 / 9	3 / 1 / 6	0 / 6 / 4
sows	1 / 3 / 6	0 / 0 / 10	0 / 1 / 9
4 w	0 / 2 / 8	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
7 w	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
10 w	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
13 w	0 / 0 / 8	0 / 0 / 10	2 / 3 / 5
16 w	1 / 0 / 9	0 / 1 / 9	0 / 0 / 10
20 w	0 / 4 / 4	5 / 3 / 2	0 / 1 / 9
24 w	0 / 3 / 7	9 / 0 / 1	7 / 3 / 0

Fig. 3

88
58

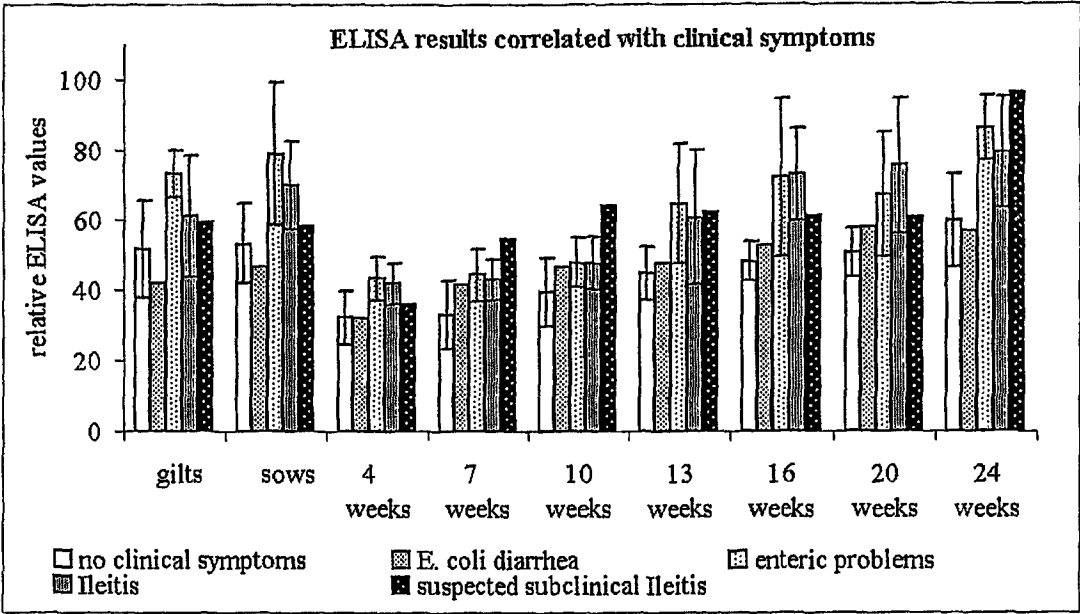


Fig. 5

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la salud animal y en particular a
5 *Lawsonia intracellularis*. En particular, la invención se refiere a un método de diagnóstico de infección por *Lawsonia intracellularis* y a un estuche de ensayo de diagnóstico usando anticuerpos específicos de *Lawsonia intracellularis*. La invención también se refiere al uso del método o del estuche de ensayo para diagnosticar infecciones por *Lawsonia intracellularis*.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

L. intracellularis, el agente causante de enteropatía proliferativa porcina ("EPP"), afecta prácticamente a todos los animales, incluyendo: seres humanos, conejos, hurones, hámsters, zorro, caballos y otros animales tan diversos como avestruces y emús. *L. intracellularis* es una causa particularmente grande de pérdidas
15 en manadas de animales de la especie porcina en Europa así como en los Estados Unidos

Una característica coherente de la EPP es la presencia de bacilos intracitoplasmáticos curvados, no ligados a membrana, dentro de enterocitos en las porciones del intestino afectadas. Las bacterias asociadas con EPP se han referido
20 como "organismos de tipo *Campylobacter*." S. McOrist et al., Vet. Pathol., Vol. 26, 260-264 (1.989). Se han identificado posteriormente las bacterias causantes como un género y una especie taxonómicos, nuevos, denominados en nuestro idioma simbiote ileal (siglas inglesas: IS) intracelular. (C. Gebhart et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1.993). Más recientemente, se ha dado a estas
25 nuevas bacterias el nombre taxonómico *Lawsonia (L.) intracellularis* S. McOrist et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820-825 (1.995). Se han usado estos tres nombres, de manera intercambiable, para referirse al mismo organismo como se identifica y se describe además en la presente memoria.

L. intracellularis es una bacteria intracelular obligatoria que no puede ser
30 cultivada por métodos bacteriológicos normales en medios convencionales, exentos de células, y se ha pensado que para crecer precisa células epiteliales unidas. S. McOrist et al., Infection and Immunity, Vol. 61, No. 19, 4.286-4.292 (1.993) y G. Lawson et al., J. of Clinical Microbiology, Vol. 31, No. 5, 1.136-1.142 (1.993) discuten el cultivo de *L. intracellularis* usando monocapas de células epiteliales intestinales de rata IEC-18 en

matraces convencionales para el cultivo de tejidos. Además, H. Stills, Infection and Immunity, Vol. 59, No. 9, 3.227-3.236 (1.991) discute usar monocapas de células intestinales embrionicas humanas Intestine 407 y monocapas de células de adenocarcinoma colónico de conejillo de Indias GPC-16, en matraces convencionales para el cultivo de tejidos.

En particular, se puede cultivar *L. intracellularis* por métodos conocidos en la técnica, preferiblemente, de acuerdo con las patentes de EE.UU. Nos. 5.714.375 y 5.885.823. Por ejemplo, se pueden inocular primero células de cultivo con un inóculo que comprenda bacterias *L. intracellularis* de manera que se infecten las células con las bacterias. Se pueden usar numerosas líneas celulares en la práctica de la invención, incluyendo, pero no limitándose a, células epiteliales intestinales de rata IEC-18 (ATCC 1589), células de carcinoma epidermoide humano HEp-2 (ATCC 23), células (no especificadas) de ratón McCoys (ATCC 1696), células de riñón de mono verde y búfalo BGMK (Biowhittaker #71-176) y células epiteliales intestinales de animales de la especie porcina. Las células de cultivo preferidas son células HEp-2, McCoys o IEC-18.

Si se usan células de cultivo, previamente a que se inoculen, las células pueden estar en la forma de una monocapa. Para formar una monocapa, se pueden sembrar las células en matraces convencionales. Cada matraz se siembra generalmente con, entre aproximadamente 1×10^5 células y aproximadamente 10×10^5 células por matraz o frasco rotativo de 25, 75, 150, 850 cm² mezclado con medio de crecimiento. El medio de crecimiento puede ser cualquier medio para cultivo celular que incluya una fuente de nitrógeno, factores de crecimiento necesarios para las células de cultivo elegidas y una fuente de carbono tal como glucosa o lactosa. El medio de cultivo preferido es DMEM enriquecido con F 12 de Ham con suero bovino fetal al 1-5%, aunque se pueden usar otros medios de cultivo comercialmente disponibles, con buenos resultados

El cultivo exitoso de *L. intracellularis* se incrementa manteniendo las células de cultivo en un estado de crecimiento constante. Por lo tanto, la monocapa de células de cultivo debería estar, en el momento de la inoculación, a confluencia de aproximadamente 20 por ciento a aproximadamente 50 por ciento. Preferiblemente, las células deberían estar a confluencia de aproximadamente 30 por ciento a aproximadamente 40 por ciento, en el momento de la inoculación, lo más preferiblemente a confluencia de aproximadamente 30 por ciento.

61
61

Alternativamente, las células, previamente a que se inoculen, se pueden cultivar en suspensión, como se *infradescribió*. Preferiblemente, primero se cultivan las células a confluencia del 100% en la forma de una monocapa en un sistema de tipo adherente, por ejemplo, un sistema de frascos rotativos y después se transfieren a 3-
5 3.000 litros y se cultivan en suspensión

El inóculo puede ser un cultivo de *L. intracellularis* obtenido a partir de animal de la especie porcina u otros animales, infectados.

El inóculo puede ser un homogeneizado intestinal preparado raspando la mucosa del íleon de un animal de la especie porcina u otro animal, infectado con EPP.
10 Cuando se prepara un homogenizado intestinal, los cortes del íleon seleccionados para el cultivo deberían mostrar lesiones graves, con gran engrosamiento del intestino. A causa de la naturaleza frágil de las bacterias, las muestras deberían ser conservadas con preferencia a -70°C lo más rápidamente posible tras la necropsia. Un antibiótico al que es resistente *L. intracellularis* tal como Vancomicina, Amfotericina
15 B o miembros del grupo aminoglicósido de los antibióticos, incluyendo Gentamicina y Neomicina, por nombrar algunos, se añade preferiblemente al inóculo para suprimir la contaminación de las bacterias al tiempo que se permite el crecimiento de *L. intracellularis*. Tanto si el inóculo es un cultivo puro como un homogenizado intestinal, la inoculación de las células de cultivo se puede llevar a cabo por diversas técnicas
20 conocidas en la materia, dadas las explicaciones en la presente memoria.

Después se incuban las bacterias y/o las células de cultivo inoculadas, bajo una concentración disminuida de O₂ disuelto. A concentraciones de oxígeno disuelto por encima de 10%, el crecimiento de *L. intracellularis* es inferior al óptimo y eventualmente se produce el cese del crecimiento a concentraciones de oxígeno fuera
25 de este intervalo. Preferiblemente, las bacterias y/o las células de cultivo inoculadas se incuban en una concentración de oxígeno disuelto en el intervalo de aproximadamente 0% a aproximadamente 10%. Más preferiblemente, las bacterias y/o las células se incuban en una concentración de oxígeno en el intervalo de aproximadamente 0% a aproximadamente 8%, siendo lo más preferido con una
30 concentración de oxígeno de aproximadamente 0% a aproximadamente 3,0%.

También es importante para el crecimiento apropiado de *L. intracellularis* una concentración apropiada de dióxido de carbono. A concentraciones de dióxido de carbono superiores a 0% e inferiores a 4%, se produce un crecimiento que no es el óptimo, y eventualmente se produce el cese del crecimiento a concentraciones de

dióxido de carbono fuera de este intervalo. Preferiblemente, la concentración de dióxido de carbono está en el intervalo de aproximadamente 6% a aproximadamente 10%, siendo lo más preferido con una concentración de dióxido de carbono de aproximadamente 8,8%.

5 Además, las células se incuban preferiblemente a una concentración de hidrógeno en el intervalo de aproximadamente 73% a aproximadamente 96%. Se puede usar nitrógeno en lugar de parte o todo el hidrógeno presente. Lo más preferiblemente, las células se incuban en aproximadamente 0 a aproximadamente 8,0% de O₂, aproximadamente 8,8% de CO₂ y aproximadamente 83,2% de H₂.

10 Se pueden incubar las células inoculadas en un incubador de doble gas u otras cámaras de gases que contengan las concentraciones apropiadas de hidrógeno, oxígeno y dióxido de carbono y que permitan que se suspendan las células durante la incubación. La cámara debería comprender un medio para mantener en suspensión las células inoculadas y un detector de gases y una fuente de suministro para
15 suministrar y mantener las concentraciones apropiadas de gases. La temperatura de incubación debería estar en el intervalo de 30°C a aproximadamente 45°C y es más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 36°C a aproximadamente 38°C. Lo más preferiblemente, la temperatura es aproximadamente 37°C. El equipo necesario para el cultivo y la atenuación está fácilmente disponible para aquéllos o los
20 expertos comunes en la materia, dadas las explicaciones en la presente memoria. Un ejemplo de equipo adecuado para llevar a cabo la presente invención es un incubador de doble gas, por ejemplo, el modelo 480 (Lab-Line, Melrose Park, IL) junto con frascos giratorios para mantener en suspensión las células. El equipo preferido en el momento presente comprende: un fermentador, un biorreactor, una placa de agitación
25 o un agitador rotatorio conteniendo medio de cultivo y capaz de mantener en suspensión las células de cultivo por burbujeo de gas de la concentración apropiada u otros medios de agitación mecánica y controlando continuamente los niveles de O₂ disuelto en el medio de cultivo. New Brunswick, Braun y otras compañías hacen fermentadores y biorreactores adecuados para este fin.

30 Manteniendo las células inoculadas en un estado suspendido durante la incubación, se consigue el máximo crecimiento de las células y por lo tanto de *L. intracellularis* aumentando cada exposición individual de las células a medio de crecimiento y la mezcla apropiada de hidrógeno, oxígeno y dióxido de carbono. Las células de cultivo se pueden agitar y mantener en suspensión por una variedad de

63

métodos conocidos en la materia incluyendo, por ejemplo, matraces para cultivo, frascos rotativos, cultivos de membrana, biobolsas, sistemas de biorreactor WAVE™ y frascos giratorios. Se pueden mantener en suspensión las células durante la incubación, incubando las células en un matraz giratorio dentro de un incubador de doble gas o aparato similar. La terminología "matraz giratorio", como se usa en la presente memoria, quiere decir un matraz u otro envase que emplee paletas, hélice u otros medios para agitar el cultivo y mantener en suspensión las células contenidas en el mismo.

Alternativamente, las células inoculadas se incuban hasta que las células alcanzan confluencia y después las células se ponen en un matraz giratorio que contiene medio de crecimiento y se incuban en un incubador de doble gas mientras gira el matraz. Preferiblemente, las células inoculadas se raspan o tripsinizan y se hacen pasar al matraz giratorio. Esto se puede llevar a cabo mediante diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo usando un rascador de células para desprenderlas. Una vez que las células se introducen en el matraz giratorio, la paleta del matraz giratorio se rota típicamente en el intervalo de aproximadamente 3 (30) a aproximadamente 6 rad/s (60 rpm) sobre una placa de agitación magnética para mantener en suspensión las células infectadas.

Una porción de las *L. intracellularis* cultivadas se hace pasar después a cultivo fresco para aumentar la producción de bacterias *L. intracellularis*. La terminología "hacer pasar" o las variaciones de la misma en la presente memoria quieren decir el procedimiento de transferir una porción de las *L. intracellularis* cultivadas a células de cultivo fresco para infectar las células frescas con la bacteria. La terminología "fresco", como se usa en la presente memoria, quiere decir células que aún no se han infectado por *L. intracellularis*. Preferiblemente tales células no tienen de media más de aproximadamente un día.

El pase de *L. intracellularis* en cultivos en suspensión se puede llevar a cabo retirando una porción del cultivo original y añadiéndolo a un matraz nuevo que contenga células de cultivo frescas. Si el cultivo original tiene un alto número de bacterias/ml, por ejemplo, mayor que aproximadamente 10^4 bacterias/ml, es preferible añadir entre aproximadamente 1 y 10% (volumen a volumen) de cultivo del matraz infectado a un nuevo matraz que contenga células frescas. Esto se hace preferiblemente cuando están infectadas el 50-100% de las células. Si están infectadas menos de 50% de las células, el pase se lleva a cabo preferiblemente

64
69

dividiendo el cultivo 1:2 en un nuevo matraz y aumentando a escala el volumen mediante la adición de medio de cultivo fresco. En cualquier caso, no son necesarias lisis celulares ni otras etapas, lo que contrasta directamente con el pase de cultivos en monocapa, tal como se realizaba en la técnica anterior.

- 5 Después de suficiente crecimiento de las células de cultivo y posterior infección por *L. intracellularis*, como se determina por marcado de anticuerpo fluorescente indirecto (IFA, por sus siglas en inglés), TCID₅₀ u otro método comparable, al menos una porción de las bacterias *L. intracellularis* cultivadas se recoge después. La etapa de recolección se puede llevar a cabo separando las bacterias de la suspensión
- 10 mediante diversas técnicas conocidas por los especialistas con una pericia ordinaria en la técnica, dadas las explicaciones en la presente memoria. Preferiblemente, las bacterias *L. intracellularis* se recogen centrifugando el contenido de toda la suspensión o de una porción de la misma, para sedimentar las células del cultivo, volviendo a suspender los sedimentos de células resultantes y produciendo la lisis de las células
- 15 infectadas. Típicamente, al menos una porción del contenido se centrifuga a aproximadamente 3.000xg durante aproximadamente 20 minutos para sedimentar las células y las bacterias. El sedimento se puede después volver a suspender en, por ejemplo, una solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SFG) y se hace pasar aproximadamente 20 veces por una aguja de calibre 25 para producir la lisis de las
- 20 células. Si se desea purificación adicional, se pueden centrifugar las muestras a aproximadamente 145xg durante aproximadamente cinco minutos para retirar núcleos y partículas celulares. Después se puede centrifugar el sobrenadante a aproximadamente 3.000xg durante aproximadamente veinte minutos y volver a suspender el sedimento resultante en un diluyente apropiado, tal como SFG con suero
- 25 fetal bovino (para preparar las bacterias recogidas adecuadas para liofilización, congelación o uso como inoculante) o medio de crecimiento (para preparar las bacterias recogidas más adecuadas para pase a células frescas).

- Como se mencionó previamente, se incrementa el crecimiento eficaz de *L. intracellularis* para la producción a gran escala manteniendo las células del tejido
- 30 creciendo activamente. Usar cultivos de suspensión facilita enormemente el mantenimiento de las células creciendo activamente y permite la expansión continua del cultivo y el aumento de escala. Usar un fermentador y entre aproximadamente 0 y 3% de O₂ disuelto como se explicó anteriormente, permite el crecimiento de hasta 10⁸ bacterias/ml.

68
65

Cuando se usan células de McCoy's o IEC-18, es preferible añadir: gelatina, agarosa, colágeno, acrilamida o perlas de sílice tales como microvehículos porosos Cultisphere-G (HyClone Laboratories, Logan Utah), junto con el medio de crecimiento. Sin embargo, las células HEp-2 y otras no requieren microvehículos de acuerdo con
5 los métodos usados en la presente memoria.

Para fines de mantenimiento de cultivos, con cultivos de HEp-2, se retira preferiblemente 25% a 50% del cultivo y se reemplaza con medio de cultivo fresco a intervalos semanales. Para cultivos celulares con microvehículos o perlas, se retira preferiblemente 25% a 50% del cultivo y se reemplaza con medio de cultivo fresco 1-2
10 veces por semana. Para fines de aumento de escala, se puede añadir al cultivo un 25% a 50% adicional de medio de cultivo o medio de cultivo con microvehículos.

Dependiendo de la velocidad a la que llegan a estar infectadas las células de cultivo, el pase a células frescas tiene lugar generalmente entre aproximadamente cada 2 y aproximadamente 7 días. Asumiendo que las células de cultivo llegan a estar
15 infectadas al menos el 70% dentro de 2 a 7 días, el pase tiene lugar preferiblemente entre aproximadamente cada 5 y 7 días.

El diagnóstico de antígeno de *L. intracellularis* se lleva a cabo hoy en día usando inmunofluorescencia directa y PCR. El diagnóstico de anticuerpos específicos para *L. intracellularis* se lleva a cabo hoy en día usando inmunofluorescencia. Estos
20 métodos son laboriosos y exigen mucho tiempo y no son adecuados para investigaciones a gran escala.

El diagnóstico eficaz de EPP también ha estado impedido por el tiempo requerido para cultivar las bacterias causantes. Como resultado de la presente invención, ahora es posible el desarrollo de herramientas de diagnóstico que fomenten
25 análisis rápidos y precisos para la presencia de *L. intracellularis* en muestras biológicas tomadas de animal de la especie porcina y de otros animales susceptibles de EPP.

Por lo tanto, el problema técnico que subraya la presente invención es proporcionar métodos mejorados para el diagnóstico de enfermedad por *L. intracellularis*.
30

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la salud animal y en particular a *Lawsonia intracellularis*. En particular, la invención se refiere a un método de diagnóstico de infección por *Lawsonia intracellularis* y a un estuche de ensayo de

16
66

diagnóstico usando anticuerpos específicos de *Lawsonia intracellularis*. La invención también se refiere al uso del método o del estuche de ensayo para diagnosticar infecciones por *Lawsonia intracellularis*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 Fig. 1: Resultados de ELISA de Bloqueo de acuerdo con la invención
Fig. 2: Resultados de sueros del campo 301 comparado en IFA y ELISA.
Fig. 3: Resultados de investigaciones de ELISA de bloqueo - cortes transversales de ileítis en 3 granjas.
Fig. 4: Resultados de ELISA de ileítis - 22 granjas alemanas
10 Fig. 5: Correlación de resultados de ELISA con síntomas clínicos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones de terminologías usadas en la descripción:

- Antes de las realizaciones de la presente invención, se debe observar que como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la", incluyen una referencia plural, a no ser que en el
15 contexto se dicte claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una bacteria" incluye una pluralidad de tales bacterias, la referencia a la "célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de la misma conocidos por los expertos en la materia, etcétera. A no ser que se defina de otro modo, todas las
20 terminologías técnicas y científicas usadas en la presente memoria, tienen los mismos significados que los que entiende generalmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede usar en la práctica o someter a ensayo de la presente invención, cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, los métodos, los dispositivos y los materiales
25 preferidos se describen a continuación. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan en la presente memoria como referencia con el fin de describir y exponer las líneas celulares, los vectores y las metodologías según se reseñan en las publicaciones que podían usarse en relación con la invención. Nada en la presente memoria debe ser interpretado como una admisión de que la invención no
30 tiene derecho a ser un precedente de tal descripción en virtud de la invención anterior.

Como se usa en la presente memoria, la terminología "*L. intracellularis*" quiere decir las bacterias gramnegativas curvadas, intracelulares, descritas en detalle por C. Gebhart et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1.993) y S. McOrist et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820-825 (1.995), cada

67
67

uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad; la bacteria causante que puede ser obtenida de animal de la especie porcina u otros animales, infectados con EPP de todo el mundo, dado el conocimiento en la técnica y las explicaciones en la presente memoria; y variantes o mutantes de cualquiera de las bacterias anteriores, obtenidas bien espontáneamente o artificialmente y ADN, ARN y proteínas de bacterias específicas para *L. intracellularis*, incluyendo proteínas expresadas en vectores o después de aplicación *in vivo* y también fragmentos o derivados antigénicos de *L. intracellularis*. Esta terminología también incluye aislados adaptados y aislados atenuados, como se define a continuación.

10 Como se usa en la presente memoria, la terminología 'aislado adaptado' quiere decir cualquier aislado de *L. intracellularis* que se prepare de acuerdo con las técnicas de cultivo y de pase en cultivo celular u cualquier otra técnica para replicar *L. intracellularis* para fines de preparación de antígeno.

15 Como se usa en la presente memoria, la terminología "aislado atenuado" quiere decir cualquier aislado de *L. intracellularis* que se prepare de acuerdo con las técnicas de cultivo y de pase explicadas en la presente memoria para conseguir avirulencia al tiempo que se mantengan propiedades inmunogénicas cuando se administre a un animal huésped.

20 Como se usa en la presente memoria, la terminología "cultivo a gran escala" quiere decir un nivel de cultivo de *L. intracellularis* mayor que aproximadamente 2,0 a 3,0 litros e incluye la producción sobre una escala de 100 litros o más. "Cultivo" como se usa en la presente memoria, quiere decir el procedimiento de fomentar el crecimiento, la reproducción y/o la proliferación de *L. intracellularis*.

Descripción de la invención

25 La solución al problema técnico anterior se consigue por la descripción y las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico de infección preclínica o clínica por *L. intracellularis*. Además, se detectará una respuesta inmunitaria a *L. intracellularis* y se tiene que proporcionar una herramienta para epidemiología de *L. intracellularis*.

30 Este objetivo se ha conseguido de acuerdo con la presente invención dentro del alcance de la memoria descriptiva y las reivindicaciones por medio de un método de diagnóstico de infección preclínica o clínica por *L. intracellularis*.

68
68

La invención se refiere a la detección de anticuerpos contra *L. intracellularis* y a la detección de *L. intracellularis* misma. Tales anticuerpos incluyen cualquier tipo de anticuerpo conocido por los expertos, en particular inmunoglobulinas de los subtipos: IgA, IgA soluble, IgM, IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) y también IgD, IgE.

5 Para detectar anticuerpos específicos para *L. intracellularis*, de acuerdo con la invención, el método se basa en el hecho de que:

- a) se toma una muestra líquida de un mamífero
- b) se detecta la unión específica de tal muestra líquida a antígeno de *L. intracellularis*

10 c) se compara el resultado obtenido con un control.

Como se definió anteriormente, *L. intracellularis* también incluye fragmentos o derivados antigénicos de *L. intracellularis*, que se pueden usar en un método como anteriormente.

Similarmente, de acuerdo con la invención, para detectar *L. intracellularis*, el
15 método de acuerdo con la invención es como sigue:

el método se basa en el hecho de que:

- a) se toma una muestra líquida de un mamífero
- b) se detecta la unión específica de tal muestra líquida a anticuerpos de *L. intracellularis*

20 c) se compara el resultado obtenido con un control.

La muestra líquida puede incluir fluidos corporales incluyendo muestras de: saliva, sudor, orina, sangre, secreciones, excreciones u otros fluidos corporales conocidos por el experto en el campo. En una realización preferida, la muestra líquida se recoge usando bien un envase de recogida (para orina u otro líquido), una
25 jeringa/tubo de recogida (para sangre) o algún tipo de hisopo de recogida (para saliva, sudor, etc.) Preferiblemente, si la muestra en la etapa a) es sangre, suero o plasma se aísla de esta muestra de sangre y se lleva a cabo la etapa b) con suero o plasma en vez de la muestra líquida. Con posterioridad, se lleva a cabo la etapa c) como anteriormente.

30 En una realización preferida, el método es un inmunoanálisis. En un inmunoanálisis se usan anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales específicos a *L. intracellularis*. Los inmunoanálisis de acuerdo con la invención incluyen los métodos de detección conocidos en la materia tales como el ensayo ELISA (inmunoanálisis ligado a enzimas) o el denominado ensayo ELISA de tipo

69
69

sandwich, dot-blot, inmunotransferencias, pruebas radioinmunológicas (radioinmunoanálisis RIA), ensayo de Ouchterlony basado en difusión o fluoroinmunoanálisis de cohete. Otros inmunoanálisis son el ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes indirecto o directo ("IFA, por sus siglas en inglés"). Otro

5 inmunoanálisis es el denominado inmunotransferencia (también conocido como procedimiento de transferencia de Western o inmunotransferencia). El fin de la inmunotransferencia es transferir proteínas o polipéptidos aparte por electroforesis de gel de poliacrilamida sobre un filtro de nitrocelulosa u otro vehículo adecuado y al mismo tiempo retener las posiciones relativas de las proteínas o polipéptidos

10 obtenidos a partir de la electroforesis de gel. La inmunotransferencia se incuba después con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína o al polipéptido en consideración. Estos métodos de detección se pueden usar por el experto medio para llevar a cabo la invención descrita en la presente memoria. Las referencias bibliográficas en que el experto puede encontrar los métodos mencionados

15 anteriormente y otros métodos de detección, se enumeran como sigue: *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1.986); Bullock et al., *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1.982), Vol. 2 (1.983), Vol. 3 (1.985); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in*

20 *Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1.985). Las tecnologías de circuitos integrados de proteínas sólidas y fluidas o tecnologías de micromatriz que usan reactivos marcados o no marcados son inmunoanálisis adicionales de acuerdo con la invención. Tal ensayo se describe ampliamente por ejemplo por Kozak KR, et al., *Identification of biomarkers for ovarian*

25 *cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis*. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2.003 Oct 14;100(21):12.343-8 (2.003) o por Fulton, R.J., et al., *Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrixTM system*. Clinical Chemistry 43 (9), 1.749-1.756 (1.997).

La invención además se refiere a un estuche de ensayo de diagnóstico para

30 detectar infección por *L. intracellularis* que contiene todos los elementos requeridos para llevar a cabo un método de diagnóstico de infección por *L. intracellularis* preclínica o clínica, como se describe en la presente memoria.

La invención además se refiere, en particular, a un estuche de ensayo de diagnóstico que contiene anticuerpos específicos para *L. intracellularis*.

70

La invención además se refiere, en particular, a un estuche de ensayo de diagnóstico, caracterizado por que los anticuerpos de acuerdo con la invención son policlonales.

La invención además se refiere, en particular, a un estuche de ensayo de diagnóstico, caracterizado por que los anticuerpos de acuerdo con la invención son monoclonales.

Un estuche de ensayo de diagnóstico es una colección de todos los componentes para un método de diagnóstico de acuerdo con la invención. Algunos ejemplos (no una lista exhaustiva) de otros elementos para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención incluyen envases tales como placas de 96 pozos o placas de microtítulo, tubos de ensayo, otros envases, superficies y sustratos, adecuados, membranas tales como filtro de nitrocelulosa, reactivos de lavado y amortiguadores. Un estuche de ensayo de diagnóstico también puede contener reactivos que pueden detectar anticuerpos ligados tales como por ejemplo anticuerpos secundarios marcados, cromóforos, enzimas (por ejemplo, conjugadas con anticuerpos) y los sustratos de los mismos u otras sustancias que sean capaces de unir anticuerpos.

Las bacterias *L. intracellularis* se describen en la presente memoria o se conocen en la técnica o los componentes procedentes de tales bacterias, se pueden usar como antígeno en un ELISA u otro inmunoanálisis, tal como un ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes ("IFA"), para detectar anticuerpos para *L. intracellularis* en el suero y otros fluidos corporales de animales que se sospecha que están infectados con las bacterias. El inmunoanálisis preferido en el momento presente es un IFA, como se describe en el ejemplo a continuación. Alternativamente, las bacterias de la invención inmediata se pueden usar en un ensayo de inmunotransferencia.

El protocolo de la Inmunotransferencia preferida es como sigue:

1. Hacer antígeno sobre SDS-PAGE al 12% y transferir a membrana de nitrocelulosa.
2. Poner membrana en amortiguador de bloqueo durante 2 horas.
3. Retirar amortiguador de bloqueo y enjuagar con PBS durante 1 minuto.
4. Diluir suero en amortiguador de bloqueo y añadir a membrana. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Lavar 3 veces con amortiguador de lavado (5 minutos para cada lavado).

7/7

6. Diluir un anticuerpo específico de *anti-L.intracellularis* conjugado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, en amortiguador de bloqueo y añadir a membrana. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar 3 veces con amortiguador de lavado.
- 5 8. Añadir sustrato durante 10 minutos o hasta que tenga lugar bandeo intenso.
9. Enjuagar con PBS.
10. Secar al aire y conservar en la oscuridad.

El conjugado unido al anticuerpo podía ser por ejemplo una enzima, tal como una peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) o fosfatasa alcalina (FA). Alternativamente, un cromóforo o cualquier otra sustancia detectable que se pueda cuantificar en presencia de un sustrato, se puede usar como conjugado.

El inmunoanálisis más preferido de acuerdo con la invención es un ELISA.

Lo más preferiblemente, tal ELISA es un ELISA de tipo sandwich (= ELISA de captura). Tal ELISA es más específico, ya que detecta con dos anticuerpos específicos a dos diferentes epítomos sobre el mismo antígeno. En un ELISA de tipo sandwich, se recubren los anticuerpos no marcados en las placas de microtítulo. La *L. intracellularis* como antígeno se añade con posterioridad. Después de una etapa de lavado, el antígeno de *L. intracellularis* ligado se detecta con un segundo anticuerpo específico de *L. intracellularis* marcado, reactivo con un diferente epítomo sobre *L. intracellularis*.

Un procedimiento de recubrimiento ejemplar es como sigue:

Las placas se recubren con anticuerpo no marcado, por ejemplo, en sacarosa al 10%/Suero Normal de Caballo al 10% en ddH₂O y se incuban con antígeno de *Lawsonia intracellularis*. Las placas se secan después y se sellan y se conservan a 37°C. Alternativamente, se conservan las placas recubiertas de anticuerpo y se añade el antígeno cuando se realiza el ELISA.

Un protocolo ELISA preferido de acuerdo con la invención es como sigue (uso de placas recubiertas de anticuerpo):

1. Añadir 0,1 ml/pozo de antígeno diluido en amortiguador de recubrimiento. Incubar durante 18 horas a 4°C.
2. Lavar 3 veces con PBS.
3. Añadir 0,25 ml de amortiguador de bloqueo a cada pozo de la placa. Incubar 1 a 2 horas a 37°C.
4. Lavar 3 veces con amortiguador de lavado.

5. Diluir suero en amortiguador de bloqueo y añadir 0,1 ml a los primeros pozos de la placa. Hacer series de diluciones 1:2 de un lado a otro de la placa. Incubar durante 1 hora a 37.
6. Lavar 3 a 5 veces con amortiguador de lavado.
- 5 7. Diluir un anticuerpo específico de *anti-L.intracellularis* conjugado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, en amortiguador de bloqueo y añadir 0,1 ml a pozos de la placa e incubar durante 1 hora a 37°C.
8. Lavar 3 a 5 veces con amortiguador de lavado.
9. Añadir substrato.
- 10 10. Medir la absorbancia de luz con un espectrofotómetro.
11. Se usan los pozos en que no se añadió antígeno como muestras para ensayo en blanco.
12. También se debería usar suero de animal de la especie porcina de control, positivo y negativo, con cada ensayo.
- 15 Un ELISA preferido se lleva a cabo como sigue:
- Las placas se recubren con anticuerpo no marcado, por ejemplo, en sacarosa al 10%/Suero Normal de Caballo al 10% en ddH₂O y se incuban con antígeno de *Lawsonia intracellularis*. Las placas se secan después y se sellan y se conservan a 37°C.
- 20 1. Añadir 90 µl de amortiguador a cada pozo.
2. Añadir 10 µl de suero en pozos seleccionados.
3. Incubar la placa durante 1 hora a 37C.
4. Lavar la placa 3 veces con PBST.
5. Añadir anticuerpo específico de *anti-L.intracellularis* conjugado de HRP, preferiblemente un anticuerpo monoclonal diluido en CDS-C+NaCl 0,5M, 100µl /pozo.
- 25 6. Incubar la placa durante 1 hora a 37C.
7. Lavar la placa 3 veces con PBST.
8. Añadir substrato, 100 µl/pozo e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 30 9. Añadir 50 µl interrupción/pozo.
10. Leer la placa a 450 nm en un espectrofotómetro.

El protocolo ELISA de tipo sandwich más preferido de acuerdo con la invención es como sigue:

73
73

1. Añadir 0,1 ml/pozo de mAb diluido en amortiguador de recubrimiento. Incubar durante 18 horas a 4°C.
2. Lavar 3 veces con PBS.
3. Añadir 0,1 ml/pozo de antígeno diluido en amortiguador a cada pozo de la placa. Incubar 1 a 2 horas a 37°C.
4. Lavar 3 veces con amortiguador de lavado y/o añadir directamente 0,25 ml de amortiguador de bloqueo a cada pozo de la placa. Incubar 1 a 2 horas a 37°C.
5. Lavar 3 veces con amortiguador de lavado.
6. Diluir suero en amortiguador de bloqueo y añadir 0,1 ml a los primeros pozos de la placa. Hacer series de diluciones 1:2 de un lado a otro de la placa. Incubar durante 1 hora a 37.
7. Lavar 3 a 5 veces con amortiguador de lavado.
8. Diluir anticuerpo específico de *anti-L.intracellularis* conjugado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal en amortiguador de bloqueo y añadir 0,1 ml a pozos de la placa e incubar durante 1 hora a 37°C.
9. Lavar 3 a 5 veces con amortiguador de lavado.
10. Añadir substrato.
11. Medir la absorbancia de luz con un espectrofotómetro.
12. Se usan los pozos en que no se añadió antígeno como muestras para ensayo en blanco.
13. También se debería usar suero de animal de la especie porcina de control, positivo y negativo, con cada ensayo.

El antígeno como se usa en la presente memoria es *L. intracellularis*, como se definió anteriormente. mAb se refiere a un anticuerpo monoclonal específico para *L. intracellularis*. Preferiblemente, tal anticuerpo es un anticuerpo como se describe a continuación.

Sorprendentemente, los anticuerpos relevantes se generaron para que se usaran en el ELISA de acuerdo con la invención. Los anticuerpos tienen los siguientes números de referencia: 301:39, 287:6, 268:29, 110:9, 113:2 y 268:18. Todos los anticuerpos son específicos para antígenos de bacterias *L. intracellularis*. Preferiblemente como anticuerpos de captura en un ELISA de tipo sandwich son: 110:9, 113:2 ó 287:6 y como anticuerpos conjugados 268:18, 268:29 ó 287:6. Como anticuerpo de captura el más preferido es el anticuerpo 110:9 y como anticuerpo

74
74

conjugado es el anticuerpo 268:29.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen por células de hibridoma. Dichas células de hibridoma de acuerdo con la invención, están depositadas en el Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR) y European
5 Collection of Cell Cultures (ECACC)", Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido, como depósito de patentes de acuerdo con el Tratado de Budapest. La fecha de depósito fue 11 de mayo de 2.004. LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 110:9 se deposita con éxito bajo ECACC Reg. No. 04092204. LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 113:2 se deposita con éxito bajo ECACC Reg. No. 04092201. LÍNEA
10 CELULAR DE HIBRIDOMA 268:18 se deposita con éxito bajo ECACC Reg. No. 04092202. LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 268:29 se deposita con éxito bajo ECACC Reg. No. 04092206. LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 287:6 se deposita con éxito bajo ECACC Reg. No. 04092203. LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 301:39 se deposita con éxito bajo ECACC Reg. No. 04092205.

15 La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no deben ser considerados limitantes. Por supuesto, otras variantes de la invención serán fácilmente evidentes para un experto en la materia.

Todas las publicaciones y patentes citadas en la presente memoria se
20 incorporan por referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

1.0 Material

Línea celular de hibridoma anti-Lawsonia: 372:13, 113:2, 268:18, 287:6, 110:9,
25 268:29, 301:39.

Equipo y medios de cultivo para cultivo de células de hibridoma.

Equipo y amortiguadores para la purificación y la conjugación de HRP de anticuerpos (mAb) monoclonales.

Equipo y soluciones para ELISA

30 Antígeno de Lawsonia SF 1289 N343 12/20/00

Sueros positivos de Lawsonia: lote#052902cerdo#26 (infectado experimentalmente),

lote#052902cerdo#69 (vacunar)

sueros negativos de Lawsonia: p 25,8#273 Día 52 6-30-95,

75
75

116705

1.1 Métodos

La preparación de los anticuerpos monoclonales se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos de operación clásicos en Svanova Biotech.

5 1.1.1 Cultivo de células de hibridoma y preparación de anticuerpos monoclonales conjugados de HRP

- Para asegurar las líneas celulares de hibridoma se prepararon 15 viales de cada línea celular y se conservaron a -135°C .
- Se descongeló un vial de cada línea celular de hibridoma y las células se cultivaron en matraces para cultivo de células.
- Se purificaron 500 ml a 1.000 ml de sobrenadante de cada línea celular y se conjugaron a peroxidasa de rábano.

1.1.2 ELISA de Bloqueo

Se ensayó en el mAb purificado y conjugado de HRP su capacidad para que se bloquee por sueros de cerdo de Lawsonia positivos en ELISA.

- La placa de ELISA se recubrió con antígeno de Lawsonia en una dilución de 1/200, 100 μl /pozo
- Los sueros de cerdo se diluyeron 1/10, 100 μl /pozo
- Se diluyó el mAb conjugado de HRP y se añadió, 100 μl /pozo.

Los resultados se expresan como Porcentaje de inhibición (PI) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{PI} = 1 - (\text{muestra OD} / \text{mAb OD}) \times 100.$$

1.2 Resultados

25 1.2.1 Cultivo de células de hibridoma y preparación de anticuerpos monoclonales conjugados de HRP

- Todos los mAb menos uno se purificaron con éxito y se conjugaron de HRP. Tuvieron buena capacidad de producción.
- mAb 372:13 tuvo una capacidad de producción deficiente. Este mAb no se conjugó con éxito a HRP y por lo tanto no se ensayó en el ELISA de bloqueo.

1.2.2 ELISA de Bloqueo

- Se usaron dos sueros positivos (#26, #69) y dos negativos (25,8#273, 116705) en los experimentos.
- Los sueros (#26) infectados experimentalmente inhibieron los seis mAb

26
26

conjugados de HRP, pero en niveles diferentes. Los sueros de un cerdo vacunado inhibieron el mAb en mucha menor medida.

- Los sueros negativos no mostraron inhibición o muy baja.

Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en la Fig. 1.

5

	mAb					
Suero	301 : 39	110 : 9	268 : 29	287 : 6	113 : 2	268 : 18
#26 exp						
+	57	45	78	74	42	72
#vac 69						
+	18	23	52	43	45	25
25,8#273						
-	7	3	27	20	14	21
116705						
-	-7	-9	-24	-13	18	-19

1.3 Discusión

Los resultados de este estudio muestran claramente que uno o más de los anticuerpos monoclonales ensayados son adecuados para un ensayo ELISA de bloqueo contra *Lawsonia intracellularis*. Los mAb 268:29, 287:6 y 268:18 muestran la distinción más clara entre los sueros positivo y negativo, es decir, son fuertes candidatos en el desarrollo del ELISA de bloqueo.

EJEMPLO 2

2.0 Sumario

Desarrollo y establecimiento de un prototipo de b-ELISA de tipo sandwich para la detección de anticuerpos para *Lawsonia intracellularis*:

Después del cálculo de la sensibilidad y la especificidad usando análisis de inmunofluorescencia IFA como patrón de oro se pudo concluir lo siguiente:

- Capturar mAb 110:9 da una clara distinción entre muestras positivas y negativas.
- La detección de mAb 268:29 HRP da una clara distinción entre sueros positivo y negativo, que muestra una sensibilidad y especificidad de 100%.
- Se recomienda que el prototipo sea como sigue:

77
77

- mAb 110:9 como mAb de captura, recubierto en tiras C-8 de maxi-sorc de Nunc
- Antígeno (Ag): Cultivo de *Lawsonia intracellularis* (preferiblemente el material concentrado producido en R&D a BI)
- 5 • Muestras de suero diluidas 1/10 en NaCl 0,5M/PBST. Incubación durante 1 hora a 37C.
- mAb conjugado de HRP 268:29, liofilizado en amortiguador CDS-C que contenía NaCl 0,5M. Incubación durante 1 hora a 37C.
- 10 • Substrato K-Blue Max, incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- solución de interrupción de Svanova

2.1 Material y métodos

Se llevó a cabo el ELISA de acuerdo con el siguiente procedimiento:

2.1.0 Procedimiento ELISA

- 15 • Añadir 90 µl de amortiguador a todos los pozos.
- Añadir 10 µl de suero a los pozos seleccionados.
- Incubar la placa durante 1 hora a 37C.
- Lavar la placa 3 veces con PBST
- Añadir mAb conjugado de HRP diluido en CDS-C+NaCl 0,5M, 100 µl /pozo.
- 20 • Incubar la placa durante 1 hora a 37C.
- Lavar la placa 3 veces con PBST.
- Añadir substrato, 100 µl/pozo e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Añadir 50 µl interrupción/pozo
- 25 • Leer la placa a 450 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados se presentaron como 1- valores OD o 2- valores PI (porcentaje de inhibición) es decir $100 - OD \text{ muestra} / OD \text{ mAb} \times 100$.

2.1.1 Ensayo 1 (ELISA 030922, 030923 x2)

- 30 Maxitiras C-8 recubiertas con mAb 110:9, 113:2, 301:39, 287:6, 268:29, 300 ng/pozo. Bloqueo de tiras con 10% de 2251HÄS(suero normal de caballo), sacarosa al 10% /UHP H₂O. 150 µl/pozo, incubados durante 30 segundos a temperatura ambiente.

Ag # 030619 diluido 1/10 en PBST, 100 µl/pozo, 3 horas de incubación en 4C.

Tiras secadas en 37C durante 3 horas. Conservadas en 4C.

Sueros: IFA pos: #26, #69. IFA neg: #6, C1, D1, E1. Diluido 1/10 en NaCl

X8
78

0,5M/PBST

Conjugado: 268:18, 113:2, 301:39110:9, 287:6, 268:29 HRP diluido en NaCl 0,5M/PBST.

5 Todo el mAb de captura se ensayó frente a todo el mAb conjugado de HRP salvo frente a sí mismo.

2.1.2 Ensayo 2 (ELISA 030924)

Tiras recubiertas con 110:9, 113:2 y 287:6 de acuerdo con el ensayo 1 anterior.

Sueros: IFA pos: #26, #69. IFA neg: #6, C1, D1, E1. Diluido 1/10 en NaCl 0,5M/PBST

10 mAb conjugado de HRP 268:18, 268:29, 287:6 diluido en NaCl 0,5M/CDS-C (amortiguador clásico para liofilización de conjugados como Svanova en la producción).

2.1.3 Ensayo 3 (ELISA 030925)

Tiras recubiertas con 110:9, 113:2 y 287:6 de acuerdo con el ensayo 1 anterior.

15 Sueros: se ensayaron 24 sueros (10 IFA pos, 10 IFA neg y 4 dudosos).

Dilución: 1/10 en NaCl 0,5M/PBST.

Conjugado: 268:18 HRP diluido en NaCl 0,5M/CDS-C.

2.1.4 Ensayo 4 (ELISA 030930, 031002, 031008)

Tiras recubiertas con 110:9 de acuerdo con el ensayo 1 anterior.

20 Sueros: 21 IFA positivo y 69 IFA negativo. Dilución: 1/10 en NaCl 0,5M/PBST

Conjugado: 268:18 conjugado con HRP y 268:29 conjugado con HRP diluido en NaCl 0,5M/CDS-C.

2.2 Resultados

2.2.1 Ensayo 1 (ELISA 030922, 030923 x2)

25 Los mAb de captura 110:9, 113:2 y 287:6 con los conjugados 268:18 y 268:29 y 287:6 parece que son los mejores candidatos para el b-ELISA de tipo sandwich ya que estas combinaciones mostraron la mejor capacidad de bloqueo en los sueros positivos. Los sueros Nº #6 obtuvieron positivo en la mayoría de los ensayos. Esto se sospechó debido a que este suero también obtuvo positivo en el prototipo b-ELISA
30 desarrollado previamente.

2.2.2 Ensayo 2 (ELISA 030924)

Este ensayo se llevó a cabo principalmente para asegurar que se podía usar el amortiguador patrón usado para liofilizar el conjugado. Los resultados muestran que el bloqueo se consiguió con los sueros positivos. El mejor bloqueo se encontró con la

79
79

detección de mAb 268:18 ó 268:29.

2.2.3 Ensayo 3 (ELISA 030925)

Se encontró que el mAb de captura 110:9 era la mejor elección ya que daba la diferenciación más clara entre muestras positivas y negativas.

5 2.2.4 Ensayo 4 (ELISA 030930, 031002, 031008)

Se pueden encontrar valores de OD y PI obtenidos en el apéndice 5. Cuando se representan gráficamente los valores OD frente a los resultados IFA el mAb 268:29 conjugado de HRP da la distinción más clara entre muestras positivas y negativas con una sensibilidad y especificidad del 100 %. mAb 268:18 también da una sensibilidad y
10 especificidad de 100% pero el área entre muestras positivas y negativas es ligera. Cuando se representan gráficamente los valores PI, el mAb 268:18 da una sensibilidad de 95,7 y una especificidad de 100% a corte 20,9 mientras que el mAb 268:29 da tanto una sensibilidad como una especificidad de 100% a corte 28,6.

2.3. Discusión

15 Después del cálculo de la sensibilidad y la especificidad frente al análisis de inmunofluorescencia IFA, se puede concluir lo siguiente:

- mAb 110:9 de captura es la mejor elección ya que da una distinción clara entre muestras positivas y negativas.
- Detección de mAb 268:29 conjugado con HRP es la mejor elección ya que
20 da una distinción clara entre sueros positivos y negativos con una sensibilidad y una especificidad del 100%.

Se recomienda que el prototipo sea como sigue:

- mAb 110:9 como mAb de captura, recubierto en tiras C-8 de maxi-sorc Nunc
- Ag: Cultivo de *Lawsonia intracellularis* (preferiblemente el material
25 concentrado producido en R&D a BI)
- Muestras de suero diluidas 1/10 en NaCl 0,5 M/PBST. Incubación durante 1 hora a 37C.
- mAb 268:29 conjugado de HRP, liofilizado en amortiguador CDS-C que contenía NaCl 0,5M. Incubación durante 1 hora a 37C.
- 30 • Substrato K-Blue Max, incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- solución de interrupción de Svanova



EJEMPLO 3

3.1 Resumen

Los estudios de estabilidad acelerada realizados indican que la placa de ELISA capturada por antígeno de *Lawsonia intracellularis* tiene una estabilidad de al menos un año y que el conjugado 268:29 de HRP a- *Lawsonia* tiene una estabilidad de 6 a 12 meses en una forma liofilizada.

3.2 Introducción

Para estimar la estabilidad de los componentes de un futuro estuche de ELISA de *Lawsonia intracellularis* se tienen que llevar a cabo ensayos de estabilidad acelerada. El componente que se tiene que ensayar se conserva a 37C durante 4 semanas y se ensaya después en el ELISA en comparación con un componente conservado a 4C. La estabilidad de 4 semanas en 37C indica un tiempo de durabilidad de aproximadamente 12 meses. Este informe describe estudios de estabilidad acelerada realizados sobre placa ELISA capturada de antígeno y en el conjugado de HRP.

3.3 Materiales y métodos

Estabilidad acelerada sobre placas (ELISA 031024)

Las placas se recubrieron con mAb 110:9 de *Lawsonia* bloqueado con sacarosa al 10%/suero normal de caballo al 10% en ddH₂O y se incubaron con antígeno de *Lawsonia*. Las placas se secaron y se sellaron y se pusieron a +37°C. Se tomaron placas de 1, 2, 3 y 4 semanas, de +37C, y conservadas en un refrigerador. Las placas también se almacenaron en +4C durante el periodo de ensayo completo como referencia.

Se usaron sueros positivos #26, #69 y #06 y negativos C2, D1 y E2 para comprobar la realización del ELISA de tipo sandwich.

Se usó mAb 268:29 conjugado de HRP lote #030120.

Estabilidad acelerada sobre conjugado liofilizado (ELISA 031027)

Se diluyó 1/1.000 mAb 268:29 conjugado de HRP, lote #030120, en amortiguador CDS-C distribuido en frascos de vidrio y liofilizado de acuerdo con procedimientos clásicos. Se conservaron cuatro frascos liofilizados a +37C durante 1, 2, 3 y 4 semanas. También se conservaron frascos a 4C. Se ensayaron los diferentes frascos en el ELISA de tipo sandwich. Se usó como suero positivo #26 y se usaron como suero negativo 030926. Se encontró que una dilución de 1/1.000 del anticuerpo conjugado ("dilución de conjugado") daba valores OD demasiado altos en el ensayo. El

anticuerpo conjugado se valoró por lo tanto en la placa para obtener una señal correcta para el ensayo.

3.4. Resultados

Estabilidad acelerada sobre placas

5 Se vio una gran caída en los valores OD después de 1 semana comparado con el valor OD de las tiras mantenidas a +4°C. No se vieron grandes diferencias cuando se comparó la semana 1 a 4. Cuando se miran los valores PI no se encontró nada significativo entre la semana 1 a 4 y +4°C.

Estabilidad acelerada sobre conjugado liofilizado

10 A una "dilución de conjugado" de 1/8.000 el suero # 26 mostró una disminución de 0,547 a 0,398 después de 4 semanas y el suero 030926 cayó de 1,654 a 0,99 después del periodo de 4 semanas.

3.5. Discusión

15 Los estudios de estabilidad acelerada llevados a cabo indican que la placa ELISA de *Lawsonia intracellularis* tiene una estabilidad de al menos un año. El anticuerpo 268:29 conjugado de HRP de anti-*Lawsonia* mostró una disminución del 40% en el valor OD frente a los sueros negativos y después de 4 semanas. Esto podía indicar alguna inestabilidad del conjugado. Cuando se calcula en los valores OD una disminución del 40% de una señal a la media de 1,5 y el valor OD de 0,9 después de 1
20 año que está aún dentro de los criterios de aceptación.

EJEMPLO 4

4.1 Resumen

Se llevó a cabo la verificación del prototipo (lote de placa 040107) ensayando 50 sueros usados previamente cuando se desarrolló el prototipo. El estudio de
25 verificación mostró un acuerdo del 100% con los sueros positivos mientras 2 de los 25 sueros negativos obtuvieron positivo en el lote verificado.

Se encontró que se podía usar suero normal de caballo en el amortiguador de CDS-C en vez de sueros de animal de la especie porcina que es el caso hoy en día.

Se encontró que PBST que contenía PVP al 0,042% mostraba resultados
30 similares que usando los comprimidos de PBST (que contenían PVP).

4.2 Introducción

Para verificar el prototipo ELISA de tipo sandwich se tiene que ensayar un gran número de sueros en un lote de placa producido a gran escala. El estudio se realizó sobre el lote de placa 040107 que se ensayó examinando 50 muestras de suero que

82
82

previamente se habían usado para desarrollar el prototipo.

Se usó amortiguador CDS-C como conservante cuando se estaba liofilizando el conjugado de HRP. Este amortiguador contiene sueros de animal de la especie porcina. Como puede ser problemático en el futuro encontrar sueros negativos de Lawsonia para que se usen en el amortiguador de CDS-C se tiene que ensayar una alternativa. En este estudio se ensayaron suero normal de caballo y suero bovino fetal.

La mayoría del trabajo de laboratorio en este ELISA se ha llevado a cabo con comprimidos de PBST. Se ha visto que el PBST conc.20x que está incluido en estuches Svanovir no se puede usar puesto que el ensayo no diferenciará correctamente entonces entre muestras positivas y negativas. Cuando se comparan las recetas de los comprimidos y el PBST conc. 20x se encontró que todos los componentes eran el mismo salvo PVP al 0,042% (polivinilpirrolidona K25) que se incluyó en los comprimidos como un factor de estabilización. Los experimentos mostraron que cuando se añadía el PVP al PBST 20x se conseguían los mismos resultados que con los comprimidos.

4.3 Materiales y métodos

Verificación de prototipo (ELISA 040312)

50 sueros (recibidos de Bioscreen) ensayados previamente en el ELISA prototipo se ensayaron en el lote # 040107 de placa de gran escala. Se usó amortiguador de PBST conc 20x con PVP al 0,042%. Se usó lote 040308 de conjugado liofilizado.

Amortiguador CDS-C con suero normal de caballo

Ensayo ELISA 040203

El amortiguador de CDS-C se preparó con; 1- suero de animal de la especie porcina (como en TJ4/05F), 2- con suero normal de caballo y 3- con suero bovino fetal. Los amortiguadores se ensayaron como amortiguador conjugado en el ELISA. Los sueros ensayados fueron gris 2, 4, 13 y 17, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239, #26 y C2. Se usó mAb conjugado de HRP 268:29 lote #030318. Se usó PBST conc 20 x con PVP al 0,042%.

Ensayo ELISA 040311

Se ha usado suero normal de caballo que contenía amortiguador CDS-C para preparar conjugado liofilizado en dos ocasiones (040211, 040308). Se preparó el conjugado para obtener una dilución final de 1/20k, 1/25k y 1/30k. Se ensayó conjugado recién preparado en paralelo. Se usaron los sueros: #26, 1-29664, 3-29664,

83
83

A-27239, B-27239, conjunto pos 030926 y conjunto negativo 030926. Se usó mAb conjugado de HRP, 268:29, lote #030318. Se usó PBST conc 20 x con PVP al 0,042%.

PBST con PVP (ELISA 040301)

5 Amortiguador PBST concentrado 20x se diluyó 1/20 y se añadió una concentración final de PVP al 0,042%. Se ensayó este amortiguador en paralelo con comprimidos de PBST (que ya contenían PVP) y amortiguador PBST conc 20x diluido 1/20. Se usaron los amortiguadores en todas las etapas, es decir en el amortiguador de la muestra y de dilución del conjugado así como en el amortiguador de lavado.

10 Se usaron los sueros: #26, E1, 1-29664, 3-29664, A-27239, B-27239 y gris 13. Se usó mAb 268:29 conjugado de HRP, lote #030318. Se usó como amortiguador CDS-C conjugado con suero de animal de la especie porcina.

4.4. Resultados

Verificación de prototipo

15 Los resultados muestran que todos los 25 sueros previamente positivos también obtenían positivo en el lote de verificación. Dos de los 25 sueros previamente negativos obtuvieron positivo.

Amortiguador CDS-C con suero normal de caballo

20 El amortiguador que contenía suero normal de caballo mostró resultados similares al de con sueros de animal de la especie porcina.

La lectura del mAb conjugado de HRP liofilizado disminuyó a lo sumo 0,4 OD cuando se compara con el conjugado recién preparado. Esta caída se observó en ambos lotes de conjugado liofilizado. No está afectando a la realización del ensayo ya que los valores de PI calculados correspondían bien sin tener en cuenta los valores de OD obtenidos.

25

PBST con PVP

30 Los resultados muestran que solución de PBST concentrada 20x, diluida 1/20 con adición de PVP al 0,042% daba resultados similares que los comprimidos de PBST mientras PBST conc 20x diluido 1/20 sin el PVP mostraba resultados falsos negativos.

4.5. Discusión

Se llevó a cabo la verificación del prototipo (lote de placa 040107) ensayando 50 sueros usados previamente cuando se desarrolló el prototipo. El estudio de verificación mostró un acuerdo del 100% con los sueros positivos mientras 2 de los 25

89
84

sueros negativos obtuvieron positivo en el lote verificado. Los resultados "falsos" negativos son aceptables ya que la mayor importancia de este ensayo es detectar muestras positivas. No se ha demostrado tampoco que los resultados del ensayo previo sean por supuesto verdaderos.

- 5 Se encontró que PBST que contenía PVP al 0,042% mostraba resultados similares que usando los comprimidos de PBST (que contienen PVP). Los estuches futuros contendrán por lo tanto este amortiguador. Se tiene que llevar a cabo un estudio de estabilidad del PBST conc 20x con PVP para asegurar la validez de los estuches.

10 EJEMPLO 5

5.1 Introducción y Objetivos

- La detección de anticuerpos de suero frente a *Lawsonia intracellularis* se hace hasta ahora por el uso de ensayos IFA (1). Estos ensayos confían en un criterio individual y altamente subjetivo en la interpretación de resultados. Recientemente se
- 15 desarrolló un ELISA de bloqueo de tipo sandwich usando anticuerpos monoclonales altamente específicos frente a *L. intracellularis*. Los datos de este ensayo se pueden medir y evaluar sobre una base objetiva, que mejora la reproducibilidad, repetitividad y análisis comparativos. En este estudio se presentan los primeros datos comparativos al ensayo IFA, demostrando la idoneidad y realización del nuevo ensayo.

20 5.2 Material y Métodos

- Se usó el antígeno de *L. intracellularis* crecido en un cultivo de células McCoy y capturado por un anticuerpo monoclonal específico en placas de microtítulo, para detectar anticuerpos frente a *L. intracellularis* en muestras de suero porcino. Se ensayaron sueros en una dilución 1 a 10. Después de 1 hora de incubación a 37 °C se
- 25 lavaron placas con solución de PBS y Tween, se añadió anticuerpo monoclonal marcado de peroxidasa de rábano (diferente al anticuerpo de captura). Las placas se incubaron durante una hora adicional a 37 °C. Se retiraron anticuerpos no ligados por lavado. Después de incubación con substrato TMB, durante 10 min., a temperatura ambiente, se detuvo la reacción añadiendo una solución de interrupción. Se leyó el
- 30 OD₄₅₀ en un fotómetro para cada pozo. Se calcularon los resultados como porcentaje de inhibición de controles sin suero. Se usaron sueros de campo 301, ensayados en un ensayo (2) IFA validado para anticuerpos frente a *L. intracellularis*, para evaluar el nuevo ELISA. Además se usaron muestras de corte transversal (10 muestras cada una de grupos de edad 9) de dos granjas con ileítis conocida y una granja con ileítis

sospechada, para demostrar el valor de diagnóstico del ELISA en comparación con el IFA.

5.3 Resultados

Muchos sueros negativos dieron como resultado valores de inhibición negativos. Por lo tanto, el valor medido más bajo se fijó a 0 y todos los demás valores se refirieron a éste. Se declaran estos datos como "valores ELISA relativos".

Los resultados de los sueros del campo 301 se resumen en la Figura 2. El ELISA discrimina claramente entre sueros negativos (valor ELISA relativo medio 36) y positivos (valor ELISA relativo medio 89). La mayoría de las muestras que obtuvieron dudoso en el IFA fueron positivas en el ELISA. Los resultados de las investigaciones de cortes transversales en las 3 granjas se muestran en la Figura 3. Ambos ensayos detectan claramente anticuerpos frente a *L. intracellularis* en las 3 granjas.

5.4 Discusión

En comparación con los resultados del ensayo IFA el ELISA proporciona una sensibilidad mayor. En algunos grupos de las 3 granjas ensayadas el resultado del ELISA es mucho menos ambiguo que en el ensayo IFA, que da un montón de resultados cuestionables debido a fluorescencia no específica. Los perfiles serológicos en las 3 manadas correspondían bien con datos publicados previamente de manadas europeas (3,4). El aumento de los valores ELISA entre el grupo de cerdos de 10 y 16 semanas en comparación con los resultados del ensayo IFA indican que los sueros con valores ELISA relativos mayores de 55 se pueden juzgar como positivos. Este nuevo ensayo podía ayudar a mejorar el diagnóstico de ileitis en muestras de rutina. ELISA de ileitis de bloqueo nuevo proporciona una herramienta para investigación rápida y sensible de grandes cantidades de muestras sobre una base objetiva.

Referencias

1. Guedes RMC et al., 2.002. Can J Vet Res 66:99-107.
2. Knittel JP et al., 1.998. AJVR 59:722-726.
3. Biksi I et al., 2.002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, EE.UU.
4. van Aken N et al., 2002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, EE.UU.

EJEMPLO 6

6.1 Introducción y Objetivos

El diagnóstico específico de ileitis se hace hasta ahora por el uso de ensayos IFA para detección de anticuerpos (1,2) o PCR (3,4), métodos histológicos y de inmunomarcado (2,5,6) para detección de antígeno en muestras de heces o de tejido

X6
56

intestinal. Todos estos métodos presentan desventajas específicas que conciernen a la especificidad, riesgo de contaminación o carga de trabajo y no son adecuados para investigaciones de rutina de manadas en una gran escala. Así la mayoría de los ensayos de diagnóstico se hacen sólo para unos cerdos de una manada. Por el uso de un ELISA de bloqueo desarrollado recientemente el ensayo serológico se hace más fácil, más fiable y adecuado para perfil de manada. Las investigaciones de cortes transversales de 22 granjas en Alemania se llevaron a cabo para demostrar la realización de diagnóstico del nuevo ensayo.

6.2 Material y Métodos

Se ensayaron en ELISA muestras de cortes transversales de veintidós granjas alemanas. Se tomaron muestras de primerizas, cerdas y cerdos de 4, 7, 10, 13, 16, 20 y 24 semanas en cada granja (10 muestras en cada grupo de edad). Se hizo el ELISA como se describió en el ejemplo 5.

6.3 Resultados

En la Figura 4 se resumen los valores medios relativos de ELISA de las 22 granjas. Sueros de primerizas y cerdas son altamente reactivos en el ELISA, mientras son bajos los resultados de lechones destetados de 4 a 10 semanas de edad. En los cebados los valores ELISA aumentan de 13 a 24 semanas.

En la Figura 5 se correlacionan valores medios relativos de ELISA con los síntomas clínicos en las granjas. Las granjas No. 5, 6 y 15 no tuvieron problemas entéricos clínicos al tiempo del muestreo. En la granja No. 3, lechones de 4 a 13 semanas tuvieron problemas entéricos que se diagnosticaron como diarrea por *E. coli*. En la granja No. 18, ensayos serológicos previos indicaron la presencia de *Lawsonia intracellularis* en la granja sin síntomas clínicos. En las granjas No. 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 21 y 22 se diagnosticó ileítis antes del muestreo para este estudio. Las granjas No. 4, 13, 14, 16 y 20 indican problemas entéricos en productores y cebadores, en las granjas No. 4 y 13 se sospecha ileítis clínica. En la granja No. 17 no se observan señales clínicas de diarrea pero se usan antibióticos en productores y en el comienzo del engorde.

6.4 Discusión

El seroperfil resumido de las 22 granjas muestra alta reactividad en cerdas y primerizas y aumento de la reacción de anticuerpos que empieza a las 13 semanas hasta 24 semanas. Estas observaciones están de acuerdo con datos serológicos publicados hasta ahora para ileítis (7,8,9).

87

Los cerdos de las granjas sin diarrea (No. 5, 6, 15 y 18) y la granja con diarrea por *E. coli* (No. 3) no mostraron seroconversión significativa en el ELISA. En las granjas con ileítis conocida (No. 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 21 y 22) se puede detectar una seroconversión clara entre las semanas 7 y 13. Interesantemente, las muestras de la mayoría de los grupos de cerdas y primerizas son altamente reactivos en el ELISA, aunque la mayoría de estos cerdos no tenían problemas entéricos aparentes. Esto podía ser debido a una infección subclínica con *Lawsonia intracellularis*. Los resultados de la granja No. 17 parecen indicar una ileítis subclínica. El nuevo ELISA de acuerdo con la invención proporciona una herramienta poderosa para diagnóstico serológico de ileítis adecuado para ensayo de rutina de investigaciones de manadas de tamaños de muestra grandes y de cortes transversales.

Referencias

1. Knittel JP et al., 1.998. AJVR 59:722-726.
2. Guedes RMC et al., 2.002. Can J Vet Res 66:99-107.
3. Jones GF et al., 1.993. J Clin Microbiol 31: 2.611-2.615.
4. Suh-DK et al., 2.000. J Vet Sci 1:33-37.
5. McOrist S et al., 1.989. Vet Pathol 26: 260-264.
6. Huerta B et al., 2.003. J Comp Path 129: 179-185.
7. Biksi I et al., 2.002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, EE.UU.
8. van Aken N et al., 2.002. Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, EE.UU.
9. Holyoake PK et al., 1.994. J Clin Microbiol 32: 1.980-1.985.

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico de infección por *Lawsonia intracellularis* preclínica o clínica, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) se toma una muestra líquida de un mamífero
- b) se detecta la unión específica de tal muestra líquida a *L. intracellularis*
- c) se compara el resultado obtenido con un control.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que tal método es un inmunoanálisis.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que tal método es un
- 10 ELISA.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que tal método es un ELISA de bloqueo.
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se usa uno o varios anticuerpos monoclonales seleccionados del grupo que
- 15 consiste en: anticuerpo 301:39, anticuerpo 287:6, anticuerpo 268:29, anticuerpo 110:9, anticuerpo 113:2 y anticuerpo 268:18.
6. Línea celular de hibridoma ECACC Registro No. 04092204 que segrega anticuerpo 110:9
7. Línea celular de hibridoma ECACC Registro No. 04092201 que segrega
- 20 anticuerpo 113:2
8. Línea celular de hibridoma ECACC Registro No. 04092202 que segrega anticuerpo 268:18
9. Línea celular de hibridoma ECACC Registro No. 04092206 que segrega anticuerpo 268:29
- 25 10. Línea celular de hibridoma ECACC Registro No. 04092203 que segrega anticuerpo 287:3
11. Línea celular de hibridoma ECACC Registro No. 04092205 que segrega anticuerpo 301:39
12. Estuche de partes que comprende un anticuerpo monoclonal seleccionado
- 30 del grupo de: anticuerpo 301:39, anticuerpo 287:6, anticuerpo 268:29, anticuerpo 110:9, anticuerpo 113:2 y anticuerpo 268:18 y cualquier otro elemento requerido para realizar un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

not diag.
gol

Ac
stun?

kt.

89
89**MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS****RESUMEN**

La presente invención se refiere al campo de la salud animal y en particular a

5 *Lawsonia intracellularis*. En particular, la invención se refiere a un método de diagnóstico de infección por *Lawsonia intracellularis* y a un estuche de ensayo de diagnóstico usando anticuerpos específicos de *Lawsonia intracellularis*. La invención también se refiere al uso del método o del estuche de ensayo para diagnosticar infecciones por *Lawsonia intracellularis*.

10

90
90

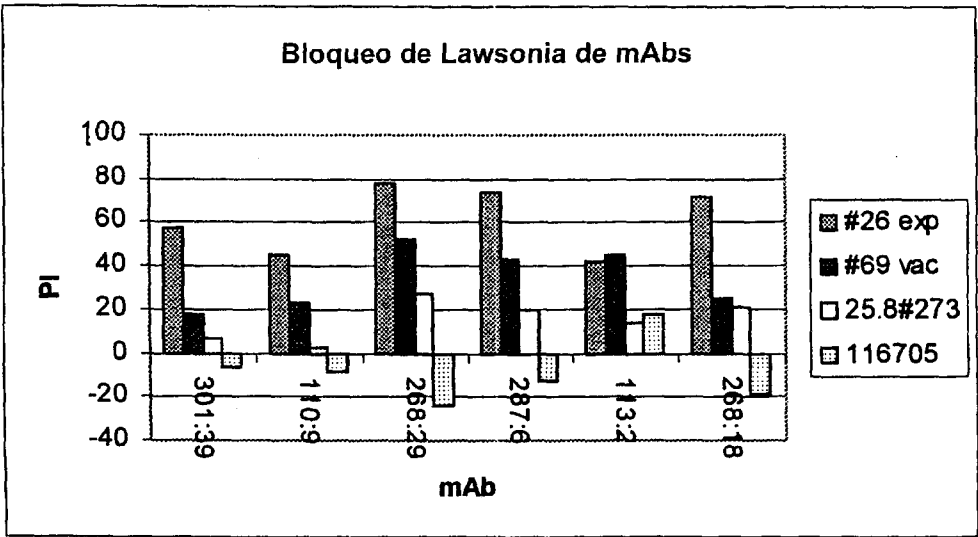


Fig. 1

91

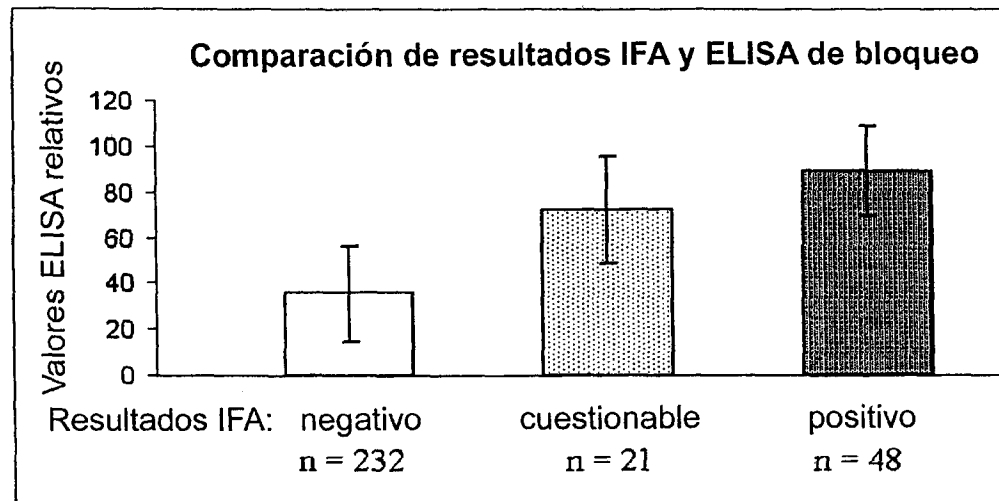
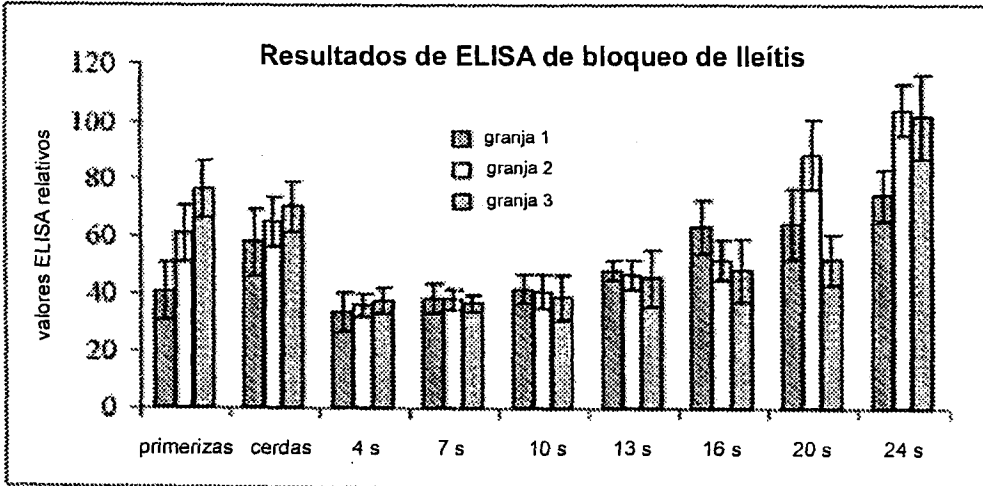


Fig. 2

92
92



Resultados ensayo IFA	granja 1	granja 2	granja 3
primerizas	0 / 0 / 9	3 / 1 / 6	0 / 6 / 4
cerdas	1 / 3 / 6	0 / 0 / 10	0 / 1 / 9
4 s	0 / 2 / 8	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
7 s	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
10 s	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10	0 / 0 / 10
13 s	0 / 0 / 8	0 / 0 / 10	2 / 3 / 5
16 s	1 / 0 / 9	0 / 1 / 9	0 / 0 / 10
20 s	0 / 4 / 4	5 / 3 / 2	0 / 1 / 9
24 s	0 / 3 / 7	9 / 0 / 1	7 / 3 / 0

Fig. 3

94
94

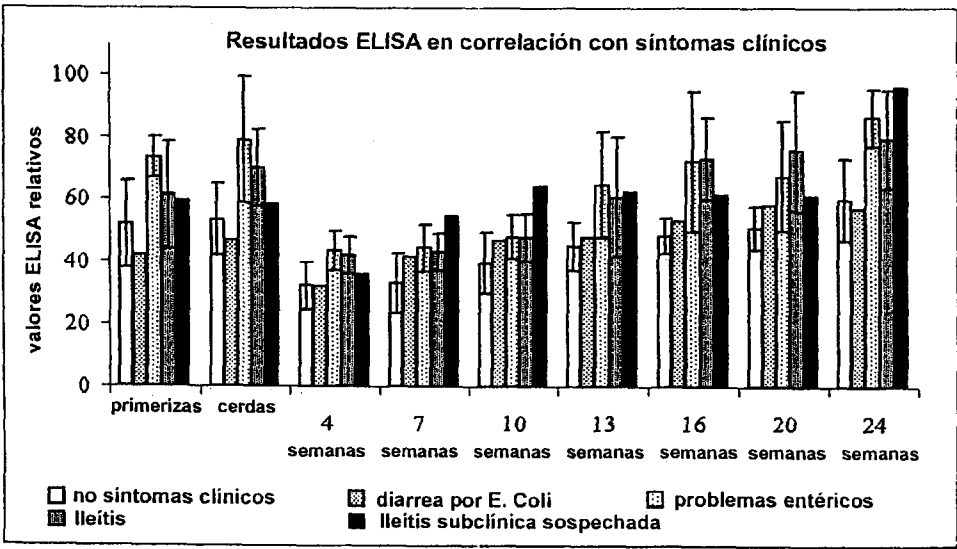


Fig. 5

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68

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)

IPC 7 G01N C07K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 714 375 A (KNITTEL ET AL) 3 February 1998 (1998-02-03) column 8, line 11 - column 8, line 44 examples 4,5	1-4
X	WO 2004/033631 A (KAPUR VIVEK ; UNIV MINNESOTA (US); GEBHART CONNIE J (US)) 22 April 2004 (2004-04-22) page P26, paragraph 3 - page P28, paragraph 2	1-4
X	EP 1 403 643 A (BOEHRINGER INGELHEIM VETMED) 31 March 2004 (2004-03-31) paragraph '0048!; claim 1 paragraph '0086!	1-4
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document but 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

14 September 2005

Date of mailing of the international search report

21/09/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klee, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/006781

96 96

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/26250 A (UNIV ARIZONA) 4 April 2002 (2002-04-04) page 23, line 29 - page 25; figure 1 -----	1-4
X	EP 1 219 711 A (AKZO NOBEL NV) 3 July 2002 (2002-07-03) paragraph '0061! -----	1-4
E	WO 2005/070958 A (AKZO NOBEL N.V; VERMEIJ, PAUL) 4 August 2005 (2005-08-04) claims 31,32 -----	1-4

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5714375	A	03-02-1998	US 5885823 A	23-03-1999
WO 2004033631	A	22-04-2004	AU 2003295341 A1	04-05-2004
			CA 2501238 A1	22-04-2004
			EP 1570045 A2	07-09-2005
EP 1403643	A	31-03-2004	DK 843818 T3	09-05-2005
WO 0226250	A	04-04-2002	AU 9315101 A	08-04-2002
			CA 2423588 A1	04-04-2002
			EP 1324768 A2	09-07-2003
			HU 0303655 A2	01-03-2004
			JP 2004529854 T	30-09-2004
EP 1219711	A	03-07-2002	NONE	
WO 2005070958	A	04-08-2005	NONE	

98

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-12/738- -00000-0000
Fec: 2006-12-20 17:22:21 Dep. 2020 NUECREACIONES
Irb. 11 PATENTE III
Evo: 3/8 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Fotos: 99

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 94.104
FECHA : DICIEMBRE 11 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55767475	11/12/2006	25,475,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 04484 841 011 2

99 ~~100~~

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- ◆ Descripción de la invención [☒]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [☐]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable 

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

100

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 101

2020
Bogotá D.C.,

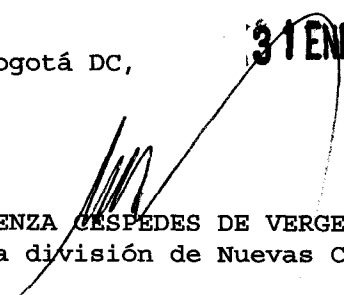
Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	06 127738
	Solicitud internacional	PCT/EP2005/006781
	Fecha inicio fase nacional	24/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	2393
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

31 ENE 2007


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10