

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **227910**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **402999**

(22) Data zgłoszenia: **05.03.2013**

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(54)

Szczepki Escherichia coli

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

15.09.2014 BUP 19/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

**MIRALEX SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Piła, PL**
**PROLAB SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ,
SPÓŁKA KOMANDYTOWA, Kraków, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

PIOTR HECZKO, Kraków, PL
MAGDALENA STRUS, Kraków, PL
SŁAWOMIR ŁAGUN, Piła, PL
ZBIGNIEW GAŁĘCKI, Skórka, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Alina Magońska

PL 227910 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy z gatunku *Escherichia coli* (*E. coli*) posiadające unikalne właściwości genetyczne.

Bakterie z gatunku *Escherichia coli* są to bakterie Gram-ujemne wchodzące w skład fizjologicznej flory bakteryjnej jelita grubego, które uczestniczą w procesie rozkładu pokarmu i produkcji witamin. W określonych warunkach bakterie te jednak wywołują schorzenia głównie układu moczowego i pokarmowego, ale również zapalenia zatok i opon mózgowych. Poznanie szczepów z gatunku *E. coli* poprzez scharakteryzowanie ich właściwości pozwala nie tylko na skuteczne przeciwdziałanie schorzeniom przez nie wywołanym, ale też wykorzystanie ich specyficznych cech do wspomagania organizmu. *E. coli* jest obecnie najważniejszym mikroorganizmem gospodarza używanym do klonowania i amplifikacji DNA w systemach inżynierii genetycznej w celu uzyskania ekspresji białek heterologicznych. *E. coli* występuje w licznych odmianach, różniących się antygenem otoczkowym (antygen K), antygenem powierzchniowym (antygenem O) i antygenem wici (antygenem H) i na tej podstawie podzielonych na liczne grupy serologiczne. Jednakże przyporządkowanie do serotypów nic nie mówi o zróżnicowanej zjadliwości tych drobnoustrojów. Stosuje się zatem do tego celu metody molekularne których celem jest wykrycie genów kodujących czynniki zjadliwości *E. coli*.

Znany jest z polskiego opisu patentowego PL 190847 sposób identyfikacji szczepu *E. coli* DSM 6601, charakteryzujący się tym, że w reakcji PCR stosuje się określoną parę starterów za pomocą których wykrywa się geny *fimA* i *focA* ulokowane na plazmidowym ewentualnie na chromosomalnym bakteryjnym DNA.

Znany jest z polskiego opisu patentowego PL 191395 nowy szczep bakterii *E. coli* NRRL B-21593 wytwarzający znaczne ilości treoniny. Wynalazek rozwiązuje problem efektywnego procesu wytwarzania L-treoniny poprzez uzyskanie szczepów mikroorganizmów które efektywnie wytwarzają aminokwasy takie jak treonina a jednocześnie są odporne na antybiotyki, który jest czynnikiem redukującym aktywność enzymatyczną. Chromosom szczepu *E. coli* NRRL B-21593 zawiera co najmniej jeden operon treoninowy (*thr*) w połączeniu z co najmniej jednym promotorem nienatywnym. Taki szczep mikroorganizmu otrzymano na drodze wprowadzania odpowiedniego materiału genetycznego.

Zakażenia dróg moczowych należą do najczęstszych zakażeń bakteryjnych u ludzi. Ponad połowa (53%) kobiet i 14% mężczyzn przechodzi przynajmniej raz w życiu epizod zakażenia dróg moczowych, co zmusza ich do około 6.8 milionów wizyt w gabinetach lekarzy domowych, 1.3 milionów pomocy udzielanych w przychodniach szpitalnych oraz 245 000 pobyków w szpitalach w ciągu jednego roku. Kumulatywny roczny koszt leczenia zakażeń dróg moczowych jest oceniany w USA na 2.4 miliarda dolarów. *Escherichia coli* jest najczęstszym (ponad 80%) czynnikiem etiologicznym poza szpitalnych, niepowikłanych zakażeń dróg moczowych, które występują u pacjentów z anatomicznie prawidłowym narządem moczowym, bez zaburzeń odpływu moczu lub zmian zapalnych. U kobiet zakażenie dróg moczowych często współwystępuje z tzw. tlenowym zapaleniem pochwy, w którym czynnikiem etiologicznym jest także *E. coli*. Następstwem zakażeń dolnych dróg moczowych w postaci ostrego zapalenia pęcherza są zakażenia wstępujące, takie jak odmiedniczkowe zapalenie nerek prowadzące do trwałego uszkodzenia nerek. Kobiety z ostrymi i nawrotowymi zapaleniami dróg moczowych zakażane są w większości przypadków tzw. uropatogennymi szczepami *Escherichia coli* (UPEC). Pałeczki te posiadają zdolność do kolonizacji i zakażenia dróg moczowych między innymi dzięki wytwarzanym powierzchniowym czynnikom wirulencji warunkującym możliwość ich zakotwiczenia się do specyficznych receptorowych cząsteczek obecnych na komórce gospodarza. Do tych czynników wirulencji zalicza się przede wszystkim adhezyny czyli białka fimbrialne typu 1, P, S, oraz Dr. Typ 1 fimbrii, spotykany najczęściej u *E. coli* wywołujących zapalenie pęcherza moczowego, przyjmuje formy wydłużonych, grubych włókien będących przedłużeniem otoczek polisacharydowych, dzięki którym może dochodzić do aglutynacji świeżych erytrocytów np. świnki morskiej. Na podstawie tej reakcji przeprowadza się test hemaglutynacji wykrywający ekspresję fimbrii typu 1. Może ona być hamowana za pomocą D-mannozy i dlatego ten rodzaj adhezyn jest również nazywany mannozo-zależnym.

Szczepy *E. coli* izolowane z moczu w większości przypadków wykazują na swojej powierzchni również obecność fimbrii typu P, które warunkują powinowactwo tych pałeczek do glikolipidowych receptorów (zawierających cząsteczki α Gal- β -(1-4)-Gal) występujących na powierzchni tkanki wyścielającej drogi moczowe gospodarza.

Inne typy fimbrii związane z UPEC stanowią fimbrie S i FIC należące do tej samej rodziny adhezyn kodowanej przez geny *sfa* i *foc*. Wiążą się z wieloma strukturami komórek układu moczowego. Natomiast adhezyny typu Dr są cechą UFEC powodujących objawowe UTI u ciężarnych kobiet, gdyż rozpoznają czynnik DAF (decay accelerating factor), składnik antygeny grupowego Dr krwinek, związany z regulacją kaskady dopełniacza eksponowany pod wpływem hormonów ciążowych.

Uropatogenne szczepy *E. coli* pochodzą głównie z przewodu pokarmowego gospodarza, a w przypadku kobiet, również pośrednio z pochwy. Namnażanie się *E. coli* na nabłonku pochwy i jej ujścia, utrzymujące się przez dłuższy okres czasu, prowadzi w konsekwencji do kolonizacji, a następnie infekcji dróg moczowych. Czasami taka kolonizacja doprowadza także do specyficznego zakażenia pochwy, tzw. tlenowego zapalenia pochwy. Tlenowe zapalenie pochwy jest stosunkowo niedawno zdefiniowanym procesem zapalnym związanym z niekontrolowanym przerostem tlenowych, bakteryjnych składników flory pochwy takich jak *E. coli* i/lub *Enterococcus faecalis* czy *Streptococcus agalactiae*. Klinicznie jest ona zbliżona do klasycznej bakteryjnej waginozy spowodowanej wzrostem populacji bakterii beztlenowych.

Większość genów warunkujących obecność fimbrii na powierzchni komórki bakteryjnej kodowana jest przez chromosomalne DNA, lub rzadziej przez plazmidowe DNA. Fimbrie mogą ujawniać się pod wpływem stymulującego działania warunków hodowlanych bakterii (czas, pasaż, temperatura, obecność antybiotyku), a ponadto wspomina się również o możliwości wywierania wpływu na tworzenie się struktur fimbrialnych na powierzchni komórki bakteryjnej przez inne współżycie w tej samym środowisku bakterie. Można powiedzieć, że typ fimbrii warunkuje zasiedlanie przez bakterie określonej niszy. Stwierdzono, że wśród bakterii wywołujących zapalenie pęcherza moczowego przeważają szczepy posiadające fimbrie typu 1. Fimbrie typu 3 stwierdzono u szczepów izolowanych z dróg oddechowych (nabłonek jamy ustnej, tchawicy). Stwierdza się znacznie wyższy stopień adhezji szczepów posiadających mieszany typ ufimbriowania. Fimbrie typu P stwierdzono głównie u szczepów *E. coli* izolowanych z moczu dlatego uważa się, że obecność fimbrii typu P zwiększa powinowactwo tych szczepów do dróg moczowych.

Celem wynalazku jest wyizolowanie nowych szczepów z gatunku *Escherichia coli* i określenie ich unikalnych, naturalnych właściwości genetycznych.

Istotą wynalazku jest nowy szczep *Escherichia coli* PL44 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu pod numerem B/00046.

Istotą wynalazku jest nowy szczep *Escherichia coli* PL53 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu pod numerem B/00047.

Istotą wynalazku jest nowy szczep *Escherichia coli* PL85 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu pod numerem B/00048.

Szczepy te zostały zdeponowane zgodnie z traktatem budapeszteńskim o międzynarodowym uznawaniu depozytu drobnoustrojów dla celów postępowania patentowego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (ul. Rudolfa Weigla 12). Nowe szczepy zostały zdeponowane w dniu 31.10.2012 r. i otrzymały numery depozytowe:

Escherichia coli PL 44 zdeponowany pod numerem B/00046

Escherichia coli PL 53 zdeponowany pod numerem B/00047

Escherichia coli PL 85 zdeponowany pod numerem B/00048

I. Badania wybranych szczepów bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*)

1. Izolacja szczepów *E. coli* z przypadków zakażeń dróg moczowych u kobiet.

Materiał do badań stanowiły szczepy *Escherichia coli* wyizolowane z próbek moczu pobranych od kobiet wykazujących objawy zakażeń dróg moczowych i zmienną bakteriurię, oraz z wymazów z pochwy pobranych od pacjentek z objawami stanu zapalnego dróg rodnych wykazujących wartość skali Nugenta pomiędzy 4 a 10. W sumie do badań wybrano 30 szczepów *E. coli*, z których 28 pochodziło z moczu, zaś 2 z pochwy.

2. Charakterystyka wyizolowanych szczepów za pomocą metod fenotypowych i genotypowych.

Przynależność zebranych szczepów do gatunku *E. coli* stwierdzono za pomocą standardowych metod genotypowych za pomocą zestawu API 20E (bioMérieux), zaś potwierdzono w oparciu o technikę PCR z zastosowaniem starterów dla genu β -galaktozydazy specyficznego dla *E. coli*.

3. Charakterystyka wyizolowanych szczepów *E. coli* pod względem czynników wirulencji za pomocą metod fenotypowych i genotypowych.

Zastosowano metodykę opisaną w pracy Johnsona i Stella polegającą na technice PCR z użyciem starterów dla najważniejszych czynników wirulencji uropatogennych szczepów *E. coli* (Tabela 2).

4. Zdolność do produkcji biofilmu w badaniach in vitro.

Oznaczanie ilościowe biofilmu metodą kolorymetryczną.

Hodowle bakteryjne założono w 96-dółkowych płaskodennych płytkach polistyrenowych. W tym celu użyto wcześniej przygotowanych hodowli zawiesinowych o OD równym 0,5 – do każdego dołka zadano po 200 µl odpowiedniej hodowli bakteryjnej. Następnie płytki inkubowano w warunkach tlenowych i temperaturze 37°C. Każdą hodowlę zawiesinową zadano w dwóch powtórzeniach, a pomiar ilości biofilmu przeprowadzono po 4, 8, 24, 48 i 72 godzinach od momentu zadania zawiesin bakteryjnych do dołków. W metodzie kolorymetrycznej ilość biofilmu mierzono wykorzystując fiolet krystaliczny. Po upływie 24 godzin od momentu zadania hodowli do dołków usunięto pożywkę, a dołki przepłukano 2-krotnie 200 µl NaCl i pozostawiono do wyschnięcia. Następnie do dołków zadano po 200 µl 1% fioletu krystalicznego i inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej, po czym przepłukano je 4-krotnie wodą destylowaną i osuszono. Związany fiolet krystaliczny rozpuszczono w 200 µl 96% EtOH i przeprowadzono pomiar absorbancji przy długości fali 585 nm. Przy każdym pomiarze uwzględniono próbę ślepą, będącą wartością absorbancji dla pustego dołka wybarwionego fioletem krystalicznym w sposób identyczny jak dołek z hodowlą.

5. Wyniki.

Wyniki badań zostały przedstawione w postaci tabel (tabela 3, tabela 4). Opisując tok przeprowadzonych badań, najpierw zostały wykonane badania mikrobiologiczne próbek moczu pobranego od kobiet z klinicznie rozpoznanymi zakażeniami dróg moczowych oraz z historią nawrotów takich zakażeń. Badania takie zostały przeprowadzone w wyspecjalizowanym laboratorium mikrobiologicznym z zastosowaniem standardowych metod ilościowych. Szczepy bakterii wyizolowanych z próbek wykazujących znamioną bakteriurię zostały następnie poddane procedurom klasyfikacyjnym, mającym na celu potwierdzenie ich przynależności do gatunku *E. coli*. W tym celu zostały zastosowane metody fenotypowe przy użyciu komercyjnego zestawu API 20E, a następnie genotypowe przy użyciu gatunkowo-swoistych starterów w metodzie PCR. W ten sposób została stworzona kolekcja wyjściowa 30 szczepów *E. coli*, która została poddana dalszym badaniom mającym na celu wykrycie w tych szczepach obecności genów kodujących czynniki wirulencji (białka lub polisacharydy odpowiedzialne za zjadliwość). Przeprowadzono wykrywanie 10 genów związanych z patogennością *E. coli* dla dróg moczowych, wykazywanych jako ważne w pracach nad zakażeniami dróg moczowych i w pracach nad konstruowaniem szczepionek. Okazało się, że badane szczepy posiadają w zróżnicowanych proporcjach 7 genów z badanych 10 genów kodujących czynniki wirulencji, występujących w 18 do 97% uropatogennych szczepach *E. coli* badanych przez innych autorów. Najczęściej w badanych szczepach występował gen *fimH*, a po nim geny *iroN* i *papC*. Dystrybucja poszukiwanych genów w badanych szczepach nie była równa. Najwięcej genów wykryto w szczepie: 53 (7 genów), poza nim szczepy 44 i 85 posiadały po 5 genów.

Ponadto przeprowadzono badania in vitro nad zdolnością skolekcjonowanych szczepów *E. coli* do tworzenia biofilmu. Tworzenie biofilmu jest obecnie uważane za wyznacznik patogenności, gdyż proces ten prowadzi do trwałego osiedlenia się bakterii na powierzchniach ciała. Jak wynika z analizy uzyskanych danych, badane szczepy znacznie się różniły zdolnością do tworzenia biofilmu, wykrywaną dwoma różnymi metodami. Niektóre z badanych szczepów wykazywały się wybitną zdolnością do tworzenia biofilmu wykrywanego za pomocą barwnika Alexa 488 po 8 i 24 godzinach. Natomiast barwienie biofilmu za pomocą fioletu krystalicznego wykazało produkcję biofilmu, która była największa w hodowlach wielu szczepów, ale najaktywniejszymi wśród nich był: 44 po 8 godzinach. Według doświadczenia stosowanie barwnika Alexa 488 najlepiej odpowiada rzeczywistej produkcji biofilmu.

6. Wnioski

Zebrane szczepy bakterii pochodzące z przypadków zakażeń dróg moczowych: nawrotowych zapaleń pęcherza i odmiedniczkowego zapalenia nerek, a także z przypadków tlenowego zapalenia pochwy i stanowiące czynniki etiologiczne tych zakażeń zostały sklasyfikowane na podstawie badań fenotypowych i genotypowych do gatunku *Escherichia coli*. Wśród badanych szczepów wystąpiło 7 z badanych 10 genów mających istotne znaczenie w patogeniezie zapaleń narządu moczowo-płciowego, przy czym kilka szczepów produkowało wszystkie z nich. Badane szczepy produkowały biofilm w różnych ilościach; kilka z nich było jego wybitnymi producentami. Zatem przeprowadzone badania dają dobre podstawy do przeprowadzenia selekcji kilku szczepów jako szczepów macierzystych do celów produkcyjnych. Selekcja taka została potwierdzona wynikami badań nad immunogennością badanych szczepów.

T a b e l a 1. Pochodzenie wybranych szczepów *E. coli*

Nr szczepu	Nr badania	Rozpoznanie	Materiał	Potwierdzona bakteriuria	Przynależność gatunkowa*
53	602	Nawrotowe zakażenie dróg moczowych	mocz	tak	E.coli
85	724	Nawrotowe zakażenie dróg moczowych	mocz	tak	E.coli
44	475	Zapalenie odmiedniczkowe nerek	mocz	tak	E.coli

* Potwierdzona za pomocą metody fenotypowej i genotypowej: testu API 20E, PCR

T a b e l a 2. Poszukiwane geny związane z patogennością szczepów *E. coli* powodujących zakażenia dróg moczowych

Gen	Czynnik wirulencji	Znaczenie w patogenności/częstość występowania w szczepach UPEC
<i>fimH</i>	Adhezyna (fimbrie) typu 1	++ /97.5%
<i>papC</i>	Fimbrie typu P	++/ 32.7%
<i>iroN</i>	Salmochelina, receptor dla żelaza	+++ / 82.7%
<i>cnf-1</i>	Cytotoksyna (cytotoksyczny czynnik martwicy typu 1)	+++ /18.5%
<i>sfaD/E</i>	Fimbrie typu S	+ /27.8%
<i>kpsMTII</i>	Antygen powierzchniowy uropatogennych szczepów <i>E.coli</i>	
<i>usp</i>	Swoiste białko uropatogennych szczepów <i>E.coli</i>	+++ /22.2%
<i>afaB/C</i>	Niefimbrialny czynnik adhezyjny typu 1/fimbrie Dr`	+ /6.2%
<i>hlyA</i>	α -hemolizyna	+ /25.3%
<i>papE/F</i>	Fimbrie typu P	+ /32.7%

T a b e l a 3. Zestawienie właściwości wybranych szczepów *E. coli*

Nr szczepu <i>E. coli</i>	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>iroN</i>	<i>cnf-1</i>	<i>sfa</i> <i>D/E</i>	<i>kps</i> <i>MTII</i>	<i>usp</i>	Pochodzenie/ rozpoznanie
53	+	+	+	+	+	+	+	Cystitis rec.
44	+	+	+	+	+	-	-	Pyelonephritis
85	+	-	+	+	+	+	-	Cystitis rec.

Legenda: (+) oznacza obecność genu; (-) oznacza brak genu

T a b e l a 4. Zdolność wybranych szczepów do tworzenia biofilmu

Nr szczepu <i>E. coli</i>	Bio film fiolet	Pochodzenie/ rozpoznanie
53	-	Cystitis rec.
44	+++	Pyelonephritis
85	-	Cystitis rec.

Legenda: (+++) oznacza silną produkcję biofilmu
(-) oznacza brak produkcji biofilmu

II Przykład wykonania

Badanie immunogenności wybranych szczepów

Cytokiny są to białka wpływające na wzrost, proliferację i pobudzenie komórek biorących udział w odpowiedzi odpornościowej. Cytokiny mogą wybiórczo pobudzać odpowiedź komórkową lub humoralną, co ze względu na ich ilość powoduje niezwykle skuteczny system powiązań pomiędzy komórkami układu odpornościowego. Cytokiny ze względu na swoją immunomodulacyjną rolę są coraz powszechniej stosowane w terapii. Do badań immunogenności wybranych szczepów *E. coli* zastosowane zostały ludzkie komórki układu immunologicznego i komórki nabłonkowe. Oceniany był poziom wybranych cytokin uwalnianych po kontakcie z badanymi bakteriami.

Ludzkie makrofagi otrzymywano z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej metodą adherencji do naczyń hodowlanych. Jest to zoptymalizowana metoda otrzymywania makrofagów ludzkich stosowana na całym świecie [Kozielec *et al.*]. Krew pochodziła od 3 zdrowych, anonimowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Krakowie. Praca z tym materiałem biologicznym nie wymaga zgody komisji etycznej. Pobrana na antykoagulant krew została poddana wirowaniu w warunkach: 400 x g, 12 min, 20°C celem odseparowania płytek krwi oraz osocza. Po odciągnięciu osocza, inaktywowano go poprzez 30-minutową inkubację w 56°C. Zarówno przed, jak i po inkubacji, osocze wirowano w następujących warunkach: 3000 x g, 15 min, 20°C. Pozostałą krew rozcieńczano roztworem PBS i nawarstwiano na roztwór do rozdzielu w gradiencie gęstości LSM, co pozwalało na rozdział komórek w następujących warunkach wirowania: 400 x g, 35 min, 20°C. Frakcje zawierające komórki jednojądrzaste zbierano do pożywki RPMI 1640 z 1% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i wirowano w warunkach: 350 x g, 12 min, 4°C. Po zlaniu nadsączy osady łączono, zawieszano w RPMI 1640 z 1% FBS, nawarstwiano na 2,5 ml FBS i wirowano w warunkach: 280 x g, 10 min, 4°C. Tak otrzymany osad zawieszano w RPMI 1640 z 10% autologicznym osoczem i 50 µg/ml gentamycyny. Komórki zliczano z wykorzystaniem komory FUCHSA-ROSENTHALA, następnie wysiewano na płytki 24 – dołkowe do hodowli komórek adherentnych w gęstości: 3 mln komórek/dołek. Po 24 h od izolacji nieadherentne komórki jednojądrzaste usuwano poprzez odpłukanie zimnym PBS, a do komórek pozostałych na płytkach dodawano świeżą porcję pożywki. Komórki były następnie hodowane przez 7 dni (37°C, 5% CO₂) w celu pełnego zróżnicowania w pożywce RPMI 1640 z 10% autologicznym osoczem.

Po zróżnicowaniu komórek, pożywka hodowlana była wymieniana na świeżą 2 godziny przed stymulacją zawiesinami bakterii. Następnie, do 600 µl pożywki RPMI 1640 z 5% FBS dodawano zawieszinę komórek bakteryjnych w następujących stosunkach makrofag : komórka bakteryjna 1 : 50 i inkubowano przez 8 godzin w 37°C, 5% CO₂. Zawiesiny komórek *E. coli* były inaktywowane termicznie albo za pomocą autoklawowania albo za pomocą metody tyndalizacji w celu porównania ich immunogenności. Kontrolę stanowiły komórki nie traktowane bakteriami, do których dodano jałowy roztwór PBS w objętości równej dodawanym zawiesinom bakteryjnym. Po zakończeniu inkubacji pożywki zbierano, wirowano 2000 x g, 5 min. 4°C i zamrażano w temp. -80°C, gdzie przechowywano, aż do momentu wykonania oznaczeń.

Pożywki hodowlane zebrane z hodowli ludzkich makrofagów przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania pomiarów. Po rozmrożeniu próbki wirowano (2000 x g, 5 min., 4°C) i poddano analizie. W celu przeprowadzenia oznaczenia użyto komercyjnych zestawów do testu ELISA dla ludzkich cytokin:

- TNFα (BD OptEIA™ Set Human TNF – Cat. No. 555212)
- IL-6 (BD OptEIA™ Set Human IL-6 – Cat. No. 555220)
- IL-8 (BD OptEIA™ Set Human IL-8 – Cat. No. 555244)
- IL-10 (BD OptEIA™ Set Human IL-10 – Cat. No. 555157)
- IFNγ (BD OptEIA™ Set Human IFNγ – Cat. No. 555142)

Test ELISA przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Płytki 96-dołkowe opłaszczano przeciwciałami anty-ludzki TNFα, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ rozcieńczonymi w stosunku 1 : 250 w buforze opłaszczającym (0,1M węglan sodu, pH 9,5) po 100 µl na dołek. Płytki inkubowano w temperaturze 4°C przez noc, a następnie płukano trzykrotnie (300 µl na dołek) buforem płuczącym (PBS 1 x 0,05% Tween 20). Następnie, dodano 200 µl buforu blokującego na dołek (PBS 1 x, 10% FBS) i inkubowano w temperaturze pokojowej, przez okres 1 godziny. Po ponownym, trzykrotnym płukaniu buforem płuczącym, na płytkę nałożono po 100 µl badanych pożywek oraz próbek standardowych zawierających cytokiny o znanym stężeniu:

- TNFα (7,8 pg/ml – 500 pg/ml),
- IL-6 (4,7 pg/ml – 300 pg/ml)
- IL-8 (3,1 pg/ml – 200 pg/ml)
- IL-10 (7,8 pg/ml – 500 pg/ml)
- IFNγ (4,7 pg/ml – 300 pg/ml)

Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, płytkę płukano pięciokrotnie buforem płuczającym. W następnym etapie dodawano zawieszonych w buforze blokującym biotynylowanych przeciwciał rozpoznających ludzkie cytokiny w odpowiednim stężeniu:

- TNFα 1 : 250
- IL-6 1 : 250
- IL-8 1 : 500
- IL-10 1 : 500
- IFNγ 1 : 250

oraz roztworu koniugantu streptawidyny z enzymem peroksydazy chrzanowej (w rozcieńczeniu 1 : 250). Inkubacja trwała 1 godzinę, w temperaturze pokojowej. Ostatecznie, po siedmiokrotnym płukaniu płytki buforem płuczającym, do każdego dołka dodano po 100 µl roztworu substratu dla peroksydazy chrzanowej (BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set). Inkubacja przeprowadzana była w ciemności przez 30 minut. Reakcję zatrzymywano poprzez dodawanie do każdej studzienki 50 µl 2 N kwasu siarkowego. Absorbancję mierzono przy dwóch długościach fali, właściwej 450 nm oraz korekcyjnej 570 nm.

Uzyskane wyniki absorbancji przeliczono na stężenie odpowiednich cytokin (wyrażone w pg/ml lub ng/ml pożywki hodowlanej) względem sporządzonych krzywych standardowych. Wartości pochodzące z 3 dawców uśredniono i zamieszczono na wykresach. Otrzymane wartości w przypadku pomiaru wszystkich badanych cytokin znajdują się w zakresie czułości stosowanych testów ELISA.

W wyniku tych badań ustalono, że stymulacja badanymi szczepami *E. coli* skutkuje indukcją sekrecji wszystkich badanych cytokin w porównaniu do komórek nie stymulowanych (PBS), wśród 9 badanych szczepów *E. coli*, wybrane szczepy: 53, 44 i 85 cechował najwyższy potencjał stymulacyjny dla badanych cytokin. Ponadto wykryto, że szczepy *E. coli* poddane tyndalizacji posiadają wyższy potencjał stymulacyjny w stosunku do autoklawowanych, co może wynikać z termicznej inaktywacji białkowych antygenów powierzchniowych lub endotoksyny bakteryjnej. Szczepy nr: 53, 44 i 85 cechuje najwyższy

potencjał aktywacyjny, który zostaje zachowany również po procesie autoklawowania, co może wskazywać na obecność termicznie odpornych struktur immunomodulacyjnych w badanych szczepach. Daje to możliwość zastosowania autoklawowanych szczepów w formie szczepionki. Odnotowana stymulacja zarówno cytokin o charakterze typowo pro-zapalnym (TNF), pro- i przeciwzapalnym (IL-6) oraz przeciwzapalnym (IL-10) wskazuje na wielokierunkowość stosowanych szczepów i może prowadzić do indukcji odpowiedzi humoralnej. Wykryto także silną ekspresję $\text{INF}\gamma$, co wskazuje na indukcję komórkowych mechanizmów zabijania drobnoustrojów, wzmagających obronę przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym.

Przebadano także poziomy uwalniania cytokin przez linię komórkową nabłonka pochwy A431 pod wpływem wybranych bakterii *E. coli*. Pożywki hodowlane zebrane znad hodowli komórek A431 przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania pomiarów. Po rozmrożeniu próbki wirowano ($2000 \times g$, 5 min., 4°C) i poddano analizie. W celu przeprowadzenia oznaczenia użyto komercyjnych zestawów do testu ELISA dla ludzkich cytokin:

- TNF α (BD OptEIA™ Set Human TNF – Cat. No. 555212)
- IL-6 (BD OptEIA™ Set Human IL-6 – Cat. No. 555220)
- IL-8 (BD OptEIA™ Set Human IL-8 – Cat. No. 555244)
- IL-10 (BD OptEIA™ Set Human IL-10 – Cat. No. 555157)
- IL-1 β (BD OptEIA™ Set Human IL-1 β – Cat. No. 557953)
- TGF β 1 (BD OptEIA™ Set Human TGF β 1 – Cat. No. 559119)
- IL-17 (eBioscience – Cat. No. BMS2017)

Test ELISA przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Płytki 96-dółkowe opłaszczano przeciwciałami anti-ludzki TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TGF β 1 rozcieńczonymi w stosunku 1 : 250 w buforze opłaszczającym (0,1M węglan sodu, pH 9,5) po 100 μl na dółek. Płytki inkubowano w temperaturze 4°C przez noc i płukano trzykrotnie (300 μl na dółek) buforem płuczającym (PBS 1 x, 0,05% Tween 20). Następnie, dodano 200 μl buforu blokującego na dółek (PBS 1 x, 10% FBS) i inkubowano w temperaturze pokojowej, przez okres 1 godziny. Po ponownym, trzykrotnym płukaniu buforem płuczającym, na płytkę nałożono po 100 μl badanych pożywek oraz próbek standardowych zawierających cytokiny o znanym stężeniu:

- TNF α (7,8 pg/ml – 500 pg/ml)
- IL-6 (4,7 pg/ml – 300 pg/ml)
- IL-8 (3,1 pg/ml – 200 pg/ml)
- IL-10 (7,8 pg/ml – 500 pg/ml)
- IL-1 β (3,9 pg/ml – 250 pg/ml)
- TGF β 1 (125 pg/ml – 8000 pg/ml)
- IL-17 (1,6 pg/ml – 100 pg/ml)

Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, płytkę płukano pięciokrotnie buforem płuczającym. W następnym etapie dodawano zawieszonych w buforze blokującym biotynylowanych przeciwciał rozpoznających ludzkie cytokiny w odpowiednim stężeniu:

- TNF α 1 : 250
- IL-6 1 : 250
- IL-8 1 : 500
- IL-10 1 : 500
- IL-1 β 1 : 1000
- TGF β 1 1 : 250

oraz roztworu koniugantu streptawidyny z enzymem peroksydazy chrzanowej (w rozcieńczeniu 1 : 250). Inkubacja trwała 1 godzinę, w temperaturze pokojowej. Ostatecznie, po siedmiokrotnym płukaniu płytki buforem płuczającym, do każdego dołka dodano po 100 μl roztworu substratu dla peroksydazy chrzanowej (BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set). Inkubacja przeprowadzana była w ciemności przez 30 minut. Reakcję zatrzymywano poprzez dodawanie do każdej studzienki 50 μl 2 N kwasu siarkowego. Absorbancję mierzono przy dwóch długościach fali, właściwej 450 nm oraz korekcyjnej 570 nm. Uzyskane wyniki absorbancji przeliczono na stężenie odpowiednich cytokin (wyrażone w pg/ml lub ng/ml pożywki hodowlanej) względem sporządzonych krzywych standardowych. Otrzymane wartości uśredniono i zamieszczono na wykresach. Otrzymane wartości w przypadku pomiaru większości badanych cytokin znajdują się w zakresie czułości stosowanych testów ELISA.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że stymulacja wybranymi szczepami *E. coli* skutkuje indukcją sekrecji wszystkich badanych cytokin w porównaniu do komórek nie stymulowanych, poziom cytokin jest znacznie wyższy w porównaniu do testowanego szczepu *Lactobacillus*, poziom stymulacji szczepami tyndalizowanymi jest porównywalny do poziomu indukcji szczepami autoklawowanymi, a ponadto, że wśród badanych szczepów *E. coli* można wyróżnić 3 (nr: 44, 53, 85), które cechuje najwyższy potencjał stymulacyjny badanych cytokin.

T a b e l a 5. Zestawienie wyników badania stymulacji produkcji badanych cytokin przez wybrane szczepy *E. coli*

Nr szczepu	Komórki nabłonkowe A 431						Makrofagi				
	<i>TNF</i>	<i>IL6</i>	<i>IL8</i>	<i>IL1</i>	<i>IFN</i>	<i>IL17</i>	<i>TNF</i>	<i>IL6</i>	<i>IL8</i>	<i>IL10</i>	<i>IFN</i>
44		T	T				T,T,T	T,T,T	A	T,T	T,T,T
53	T		T			T	T,T,T	T,T,T		T,T	T,T
85		T	T			T	T,T,T	T,T,T	T,T,A	T,T	T,T

T = stymulacja produkcji cytokin przez tyndalizowane komórki *E. coli*

A = stymulacja produkcji cytokin przez autoklawowane komórki *E. coli*

Wybrane drogą selekcji szczepy *Escherichia coli* PL 44 *Escherichia coli* PL 53 oraz *Escherichia coli* PL 85 charakteryzują się wysokim potencjałem stymulującym dla badanych cytokin. Dzięki swoim specyficznym indywidualnym cechom mogą być użyteczne w leczeniu zakażeń powodowanych przez bakterie *Escherichia coli*.

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep *Escherichia coli* PL44 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu pod numerem B/00046.
2. Szczep *Escherichia coli* PL53 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerem B/00047.
3. Szczep *Escherichia coli* PL85 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu pod numerem B/00048.

