

JACEK OSEK

# Test ELISA do wykrywania enterotoksyny LT szczepów *Escherichia coli*

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

## Summary

### ELISA for the detection of LT enterotoxin of *E. coli* strains

The aim of the study was to develop a sensitive and specific ELISA for the detection of LT enterotoxin in *E. coli* strains. The test was based on the antitoxic antibodies obtained from rabbits immunized with B subunit of cholera toxin (CT). The toxin was structurally closely related with LTB of *E. coli*. CTB was expressed in a *V. cholerae* strain harboring a plasmid with a *ctxB* gene. The toxin was isolated and purified from a growth medium by means of precipitation. A goat antirabbit IgG labeled with HRP antibodies was used as a conjugate. The developed test turned out to be highly specific and sensitive: it was possible to detect from 1.5 to 4.0 ng of LTB. One hundred strains of *E. coli* isolated from piglets were tested by the LT ELISA. It was found that 67 strains (85.9%) isolated from piglets with diarrhea were LT+ whereas only 2 strains (9.1%) from healthy piglets proved to be enterotoxigenic.

Infekcje wywołane enterotoksycznymi szczepami *Escherichia coli* (ETEC) są wciąż istotną przyczyną biegunek u prosiąt i cieląt (5, 16, 17) a także innych młodych zwierząt (4, 10, 22). Do rozwoju schorzenia dochodzi zwykle w okresie pierwszych dni życia (kolibakterioza pierwszego okresu u prosiąt i cieląt) lub też (u prosiąt) w wieku 4-6 tygodni, gdy zwierzęta są odsadzane od macior (kolibakterioza okresu odsadzania). W okresach tych, pod wpływem niekorzystnych warunków stresowych, następuje obniżenie lokalnej odporności i dochodzi do kolonizacji przewodu pokarmowego przez patogenne szczepy *E. coli*, które charakteryzują się obecnością istotnych czynników chorobotwórczości: fimbrii i enterotoksyn (5). Fimbrie warunkują adhezję komórek bakteryjnych do nabłonka jelita cienkiego podczas gdy uwalniane enterotoksyny odpowiedzialne są bezpośrednio za rozwój biegunki (22).

Szczepy *E. coli*, izolowane z przypadków kolibakteriozy prosiąt a w mniejszym odsetku od cieląt, wytwarzają najczęściej ciepłochwiejną enterotoksynę LT; niektóre szczepy produkują toksynę ciepłostalą ST lub też równocześnie obie enterotoksyny – LT i ST (16). Struktura i mechanizm działania enterotoksyny LT, niewątpliwie najbardziej istotnej z punktu widzenia patogenezы biegunki wywołanej przez ETEC, są stosunkowo dobrze poznane (12). Jest to cząstka białkowa o masie ok. 86 kDa, zbudowana z pięciu jednakowych (tzw. monomer), nietoksycznych podjednostek B (LTB) o masie 11,6 kDa, (tworzących tzw. pentamer) oraz jednej toksycznej pod-

jednostki A (LTA) o masie 27,2 kDa. LTB spełnia funkcje adhezyjne, umożliwiając przyczepność uwolnionej przez komórki *E. coli* holotoksyny do receptorów (zwykle typu GM1) nabłonka jelita cienkiego. Podjednostka A, posiadająca właściwości enzymatyczne, aktywuje cyklazę adenyloową, przekształcającą wewnątrzkomórkowy ATP w cAMP, rezultatem czego jest zwiększona sekrecja elektrolitów, zahamowanie absorpcji wody i wystąpienie biegunki (13). Enterotoksyna LT pod względem budowy, struktury antygenowej i mechanizmu działania zbliżona jest do toksyny CT, wytwarzanej przez szczepy *Vibrio cholerae* (12). Z uwagi na to, iż sekwencja aminokwasowa obu podjednostek B toksyn LT i CT jest bardzo znaczna (stopień homologii powyżej 80%) (1), istnieje możliwość użycia CTB do produkcji LTB-swoistych przeciwciał, stosowanych do testów diagnostycznych i celów eksperymentalnych. Metoda ta jest korzystna również z tego względu, iż – w przeciwieństwie do LT, która jest białkiem związanym z komórką bakteryjną – CTB w warunkach *in vitro* wydzielana jest do podłoża a tym samym łatwiejsza do izolacji i oczyszczania. Dodatkowo, istnieją skonstruowane przy pomocy inżynierii genetycznej szczepy bakteryjne, posiadające wprowadzony heterologiczny materiał genetyczny (zwykle w postaci plazmidu), pozwalający na uzyskanie bardzo dużych ilości strukturalnie jednorodnej CTB (9, 19).

W piśmiennictwie podano szereg różnych testów służących do wykrywania wytwarzanej enterotoksyny LT przez szczepy *E. coli*, izolowane z przypadków kolibakteriozy prosiąt. Obok praktycznie niestosowanych obecnie testów podwiązanych pętli jelitowych (20) są to m.in. testy z użyciem linii komórkowych (2), koagulacji (6), immunodyfuzji (7), radioimmunologiczny (3), ELISA (23), hybrydyzacji genowej (8), PCR (14). W obecnej pracy przedstawiono test ELISA służący do oznaczania ciepłochwiejnej enterotoksyny LT z użyciem surowicy anty-CTB, do produkcji której zastosowano rekombinowaną podjednostkę B toksyny CT. Badane szczepy *E. coli* hodowano bezpośrednio w mikroplytkach, znacznie zmniejszając tym samym koszt testu bez obniżenia jego swoistości i czułości.

## Materiał i metody

Szczepy bakteryjne i metody hodowlane. Do izolacji i oczyszczania podjednostki CTB użyto opisanego wcześniej rekombinowanego szczepu *V. cholerae* 1569, z którego usunięto geny kodujące wytwarzanie podjednostki CTA (9). W skrócie, modyfikacja polegała na wprowadzeniu plazmidu pML-LCTBtac2, z genami *ctxB* (kodującymi wytwarzanie CTB), znajdującymi się pod kontrolą promotora *tac* (19). Rezultatem tych manipulacji genowych był szczep 1569(pML-LCTBtac2), wytwarzający podjednostkę CTB, uwalnianą w 95% do podłoża wzrostowego. Szczep hodowano w zmodyfikowanym podłożu syncase

(15) w 37°C, 48 h, 200 rpm. Hodowle szczepów *E. coli* w kierunku wytwarzania toksyny LT wykonywano w podłożu LB z dodatkiem linkomycyny (45 µg/ml) i glukozy (2,5 mg/ml) w 37°C, 18 h, 200 rpm. Kontrolę dodatnią i ujemną stanowiły odpowiednio szczepy *E. coli* 286-C2 (LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>) i 64-111 (ST<sup>+</sup>/LT<sup>-</sup>).

**Izolacja i oczyszczanie CTB.** Hodowlę szczepu 1569(pML-LCTBtac2) odwirowano (10 000 g, 15 min.), zebrano supernatant i ustalano jego pH na 4,5 przy użyciu 6 M HCl. CTB precypitowano z roztworu przez dodanie fosforanu sodowego w ilości 1 mg/ml. Po odwirowaniu (10 000 g, 15 min.), osad zawieszano w PBS (pH 7,2), filtrowano (0,22 µm) i dializowano w stosunku do PBS. W przypadkach koniecznych, dalsze oczyszczanie wykonywano metodą ultrafiltracji przez filtr YM10 (Amicon) oraz w kolumnie z Sephadex G100 (Pharmacia). Ilość uzyskanej CTB oznaczano testem ELISA (21) w stosunku do standardu (CTB Sigma) lub testem immunodiffuzji (11) a stopień jej oczyszczenia – testami SDS-PAGE i Western blot.

**Surowice anti-CTB.** Do produkcji przeciwciał anti-CTB użyto królików rasy New Zealand, podając 4 razy podskórnie po 30 µg CTB w PBS; pierwsze dwie iniekcje wykonano z dodatkiem odpowiednio kompletnego i niekompletnego adiuwantu Freund'a. Króliki skrwawiano po 7-10 dniach od ostatniego podania antygeny a uzyskane surowice, po oznaczeniu miana anti-CTB, przechowywano w -20°C.

**SDS-PAGE i Western blot.** Oczyszczoną podjednostkę B zidentyfikowano w 13% żelu poliakrylamidowym przy pomocy zestawu Mini-Protean®II (Bio-Rad), używając stałego napięcia 200 V. CTB oznaczano w formie pentamerycznej (białko natywne) i monomerycznej (próbka poddana działaniu temperatury 100°C przez 5 min.). Rozdzielone w polu elektrycznym białka CTB wybarwiano 0,25% roztworem błękitu Coomassie R-250 (Sigma); jako standardów masy molekularnej użyto zestawu Bio-Rad o zakresie 14,4-97,4 kDa. Test Western blot przeprowadzono w zestawie Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) przy stałym napięciu 100 V przez 45 min. Rozdzielone elektroforetycznie białka przenoszono na nitrocelulozę, którą następnie umieszczano w roztworze blokującym (1% BSA-PBS) przez 1 h. Po przepłukaniu PBS, dodawano surowicę anti-CTB (w 0,1% BSA-PBS-Tween 20 0,05%) i reakcję kontynuowano przez 18 h w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu, dodawano koniugat antykróliczy (frakcja IgG) znakowany peroksydazą chrzanową (HRP) i po 2 h inkubacji wywoływano reakcję barwną przez dodanie 4-chloro-naftolu z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jako wskaźników masy molekularnej użyto zestawu Bio-Rad barwionego 0,1% roztworem czerni amidowej (Sigma).

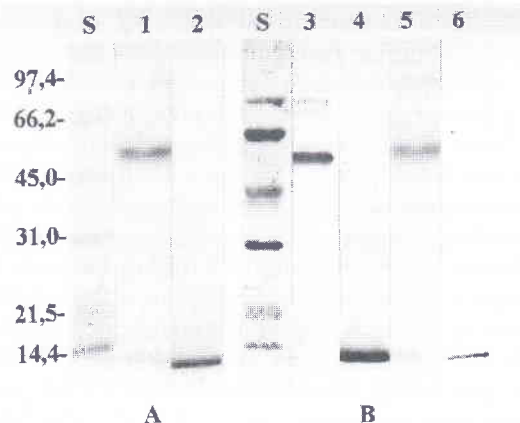
**ELISA.** Mikropłytki (Nunc) opłaszczano swoistym dla LT (CT) receptorem GM1 (Monosialoganglioside, Sigma) w stężeniu 1,5 nmol/ml PBS, 100 µl/dołek, przez 18 h w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu jałowym PBS, nieopłaszczony antygenem miejsca blokowano po 200 µl 0,1% BSA-PBS, 37°C przez 30 min. a następnie (po przepłukaniu PBS) – wypełniano podłożem LB (po 100 µl) z linkomycyną i glukozą; każdy dołek mikropłytki posiewano jedną kolonią badanego szczepu *E. coli*, inkubowanego wcześniej na agarze z krwią przez 18 h w 37°C. Tak przygotowane płytki hodowano następnie w 37°C przez 18 h w mikrowstrząsarce (Dynatech). Po tym okresie kontrolowano prawidłowość wzrostu i celem zwiększenia ilości uwalnianej toksyny LT, dodawano do hodowli po 400 µl 8 M roztworu mocznika (18) i kontynuowano inkubację przez 1 h w 37°C. Następnie, płytki płukano PBS-Tween, dodawano surowicę anti-CTB rozcieńczoną 1:10 000 w 0,1% BSA-PBS-Tween (90 min.) i po kolejnym płukaniu – koniugat kozi anty-króliczy (IgG) znakowany HRP (90 min.). Reakcję barwną wywoływano substratem enzymatycznym – OPD w

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w buforze cytrynianowym (pH 4,5) i po 20 min. odczytywano absorbencję A450 w czytniku do mikropłytek (Labsystem). Za wynik dodatni uznawano wartości A450 powyżej 0,4.

## Wyniki i omówienie

Podstawowe znaczenie w opracowaniu testu serologicznego (immunoenzymatycznego) do wykrywania enterotoksyny LT szczepów *E. coli* posiada uzyskanie odpowiednich (swoistych i o wysokim mianie) przeciwciał antytoksycznych. Najwyższą trudność stanowi zwykle efektywne izolowanie i oczyszczanie antygeny (toksyny LT), który jako białko związane z komórką bakteryjną tylko w minimalnym stopniu jest wydzielany do podłoża. W pracy użyto rekombinowanej podjednostki B toksyny cholery (CTB), będącej antygenowym analogiem LTB *E. coli*, wytwarzanej w dużych ilościach i łatwej do izolacji bez koniecznych pracochłonnych i mało wydajnych procesów oczyszczania. Użyty do produkcji CTB szczep *V. cholerae* 1569(pML-LCTBtac2) oraz optymalne podłoże wzrostowe pozwoliły uzyskać ok. 800 µg CTB w 1 ml hodowli, z której wytrącano ją precypitując fosforanem sodowym. Tak uzyskany produkt dializowano w stosunku do PBS otrzymując CTB charakteryzującą się czystością sięgającą 70% (9). W przypadku konieczności zastosowania dalszego procesu oczyszczania (ultrafiltracja i filtracja żelowa) – stopień homologii produktu był znacznie wyższy i wynosił ponad 95% (9). Ocena uzyskanej w ten sposób toksyny wykonano testem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE, ryc. 1). Stwierdzono, iż otrzymana podjednostka B toksyny CT była jednorodna i posiadała masę molekularną ok. 11,6 kDa (w formie monomerycznej) i ok. 58 kDa (w postaci pentamerycznej). Jej specyficzność oznaczono testem Western blot, używając króliczych oraz monoklonalnych przeciwciał anti-LTB (uzyskane od prof. A. M. Svennerholm, Göteborg, Szwecja). Oba rodzaje przeciwciał cechowały się wysoką swoistością w stosunku do izolowanej CTB, wytwarzanej przez szczep *V. cholerae* 1569(pML-LCTBtac2), reagując z toksyną będącą zarówno w formie pentamerycznej (ryc. 1, ścieżki 3 i 5) jak i monomerycznej (ryc. 1, ścieżki 4 i 6).

Izolowana CTB została następnie użyta do produkcji własnych swoistych surowic antytoksycznych. Uzyskano 4 surowice o różnym mianie przeciwciał anti-CTB: 300 000, 78 000,



Ryc. 1. Wyniki analizy elektroforetycznej (A) i testu immuno blot (B) izolowanej podjednostki B toksyny CT użytej do produkcji przeciwciał antytoksycznych. Poszczególne ścieżki: S. – standardy masy molekularnej wybarwiane błękitem Coomassie (A) i czernią amidową (B); 1. – CTB w formie pentamerycznej; 2. – CTB w formie monomerycznej; 3. – CTB (pentamer) i 4. CTB (monomer) w reakcji z surowicą króliczą anti-CTB; 5. CTB (pentamer) i 6. CTB (monomer) w reakcji z monoklonalnymi przeciwciałami anti-LTB



300 000 i 42 000. Surowice o najwyższych mianach, po oznaczeniu ich swoistości testami ELISA i Western blot, zostały następnie wykorzystane w opracowanym teście ELISA.

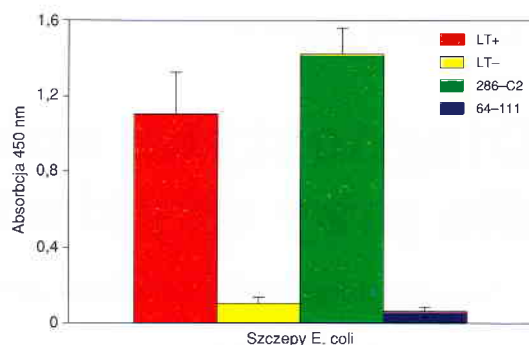
Jak wspomniano uprzednio, enterotoksyna LT wytwarzana przez szczep *E. coli* jest związana z komórką bakteryjną i tylko w minimalnym stopniu uwalniana do podłoża. Z tego względu, celem optymalnej ekspresji LT przez badane szczepy, przeprowadzono ich hodowlę w bogatym podłożu wzrostowym LB, z dodatkiem glukozy (dodatni wpływ na wzrost masy bakteryjnej) oraz linkomycyny (hamuje wzrost innej niż *E. coli* flory bakteryjnej oraz wpływa korzystnie na pozakomórkową sekrecję LT). Wzrost badanych szczepów wykonywano bezpośrednio w opłaszczonych receptorem GM1 mikroplytkach. Optymalne stężenie GM1 oznaczono wcześniej eksperymentalnie i do testu stosowano koncentrację 1,5 nmol/ml. Wykazano również, iż optymalne warunki do opłaszczania mikroplytek były następujące: GM1 zawieszony w PBS (pH 7,2) i inkubowany przez 18 h w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane płytki mogą być przechowywane w 4°C przez okres do 1 miesiąca. Hodowlę badanych szczepów *E. coli* prowadzono w mikrowstrząsarce w 37°C przez 18 h a następnie dodawano 8 M roztwór mocznika celem dalszego zwiększenia pozakomórkowego uwalniania LT i związania jej z GM1 a tym samym podniesienia czułości testu. Optymalne rozcieńczenia przeciwciał anti-CTB i koniugatu antykróliczego HRP oznaczono doświadczalnie używając jako standardu oczyszczonej CTB (Sigma).

Wykazano, iż opracowany test ELISA cechował się wysoką swoistością i czułością. Używając standardowego preparatu wysoce oczyszczonej podjednostki B toksyny CT wykonano szereg kolejnych rozcieńczeń, zaczynając od stężenia 1 µg/ml. Wykazano, iż opracowany test pozwalał na wykrycie CTB w ilościach 1,5-4,0 ng/ml, tzn. do takiego rozcieńczenia toksyny wartość absorpcji A450 wynosiła powyżej 0,4. Wykonano także seryjne rozcieńczenia hodowli referencyjnego szczepu *E. coli* LT<sup>+</sup> (286-C2) i porównano ze standardowym preparatem zawierającym 1 µg/ml oczyszczonej CTB. Również w tym przypadku można było wykryć śladowe ilości (ok. 20 ng) uwalnianej do podłoża i związanej z receptorem GM1 enterotoksyny LT.

Opracowanym testem oznaczono wytwarzanie enterotoksyny LT przez szczep *E. coli* izolowane z przypadków jelitowej postaci kolibakteriozy prosiąt oseków (42 szczepy) i odsadzonych od macior (36 szczepów). W grupie kontrolnej zbadano 22 szczepy pochodzące od prosiąt zdrowych. Stwierdzono (tab. 1), iż ogółem 67 (85,9%) szczepów wyosobnionych od prosiąt z biegunką uwalniało toksynę LT; tylko 11 (14,1%) izolatów pochodzących od tych zwierząt nie wytwarzało LT po zbadaniu opracowanym testem. W grupie kontrolnej (prosięta zdrowe) 2 szczepy (9,1%) cechowały się zdolnością wytwarzania ciepłochwiejnej enterotoksyny LT. Średnie miana absorpcji A450 dla szczepów LT<sup>+</sup> i LT<sup>-</sup>, badanych w teście

Tab. 1. Wytwarzanie enterotoksyny LT przez szczepy *E. coli* badane testem ELISA

Pochodzenie szczepów	Liczba szczepów zbadanych	Liczba (%) szczepów	
		LT <sup>+</sup>	LT <sup>-</sup>
Prosięta z biegunką - osekki	42	38 (90,5)	4 (9,5)
Prosięta z biegunką - odsadzone	36	29 (80,6)	7 (19,4)
Prosięta zdrowe	22	2 (9,1)	20 (90,9)



Ryc. 2. Średnie wartości absorpcji A450 ± odchylenie standardowe uzyskane w teście ELISA przy badaniu szczepów *E. coli* w kierunku wytwarzania enterotoksyny LT. Szczepy 286-C2 (LT<sup>+</sup>) i 64-111 (LT<sup>-</sup>) stanowiły kontrolę

ELISA, wynosiły odpowiednio (wartość średnia ± odchylenie standardowe): 1,108 ± 0,214 oraz 0,096 ± 0,037 (ryc. 2). Dla porównania – wartości A450 dla szczepów kontrolnych były odpowiednio 1,422 ± 0,140 (szczep 286-C2, LT<sup>+</sup>) oraz 0,061 ± 0,018 (szczep 64-111, LT<sup>-</sup>).

### Wnioski

1. Opracowany test ELISA, charakteryzujący się wysoką czułością i swoistością, może być wykorzystany do rutynowych badań diagnostycznych prowadzących do wykazania obecności enterotoksycznych szczepów *E. coli* jako podstawowego czynnika etiologicznego jelitowej postaci kolibakteriozy.

2. Test ten może również służyć do oceny poziomu przeciwciał anti-LT w surowicach zwierząt zakażonych lub immunizowanych szczepionkami zawierającymi nietoksyczną podjednostkę LTb, np. szczepionką Nobi-Vac Porcoli LT (Intervet).

### Piśmiennictwo

- Dallas W. S., Falkow S.: Nature 288, 499, 1980.
- Donta S. T., Sack D. A., Wallace R. B., Du Pont H. L., Sack R. B.: New Engl. J. Med. 291, 117, 1974.
- Greenberg M. B., Sack D. A., Rodriguez W., Wyatt R. G., Kalika A. R., Horswood R. L., Chanock R. M., Kapikian A. S.: Infect. Immun. 17, 541, 1977.
- Hill W. E., Madden J. M., McCardell B. A., Shah D. B., Jagow J. A.: Appl. Environ. Microbiol. 45, 1324, 1983.
- Holland R. E.: Clin. Microbiol. Rev. 3, 345, 1990.
- Honda T., Samakoses R., Sornachai C., Takeda Y., Miwatani T.: J. Clin. Microbiol. 17, 592, 1983.
- Honda T., Taga S., Takeda Y., Miwatani T.: J. Clin. Microbiol. 13, 1, 1981.
- Lanate C. F., Kaper J. B., Baldini M. M., Black R. E., Levine M. M.: J. Infect. Dis. 152, 1087, 1989.
- Lebens M. R., Johansson S., Osek J., Lindblad M., Holmgren J.: Bio/Technology 11, 1574, 1993.
- Madany J., Pomorski Z.: Magazyn Wet. 3, 10, 1994.
- Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F.: Immunochemistry 2, 235, 1965.
- Merritt E. A., Hol W. G. J.: Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 165, 1995.
- Middlebrook J. L., Dorland R. B.: Microbiol. Rev. 48, 199, 1984.
- Olive D. M.: J. Clin. Microbiol. 27, 261, 1989.
- Osek J., Lebens M., Holmgren J.: J. Microbiol. Meth. 24, 117, 1995.
- Osek J., Truszczyński M.: Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 15, 285, 1992.
- Pejsak Z., Osek J.: Magazyn Wet. 2, 25, 1993.
- Qu Z. H., Boesman-Finkelstein M., Finkelstein R. A.: J. Clin. Microbiol. 29, 773, 1991.
- Sanchez J., Holmgren J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 481, 1989.
- Smith H. W., Halls S.: J. Path. Bact. 93, 531, 1967.
- Svennerholm A. M., Holmgren J.: Curr. Microbiol. 1, 19, 1978.
- Wray C., Morris J. A.: J. Hyg. 95, 577, 1985.
- Yolken R. M., Greenberg M. B., Merson M. H., Sack R. B., Kapikian A.: J. Clin. Microbiol. 6, 439, 1977.

Adres autora: dr Jacek Osek, ul. Kościuszki 12/24, 24-100 Puławy