

Katarzyna Kasperkiewicz¹, Magdalena Noszczyńska^{1*}, Anna Piszczek¹

¹Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Wpłynęło w grudniu 2014 r.

1. Historia odkrycia. 2. Występowanie. 3. Charakterystyka chemiczna. 4. Formy ECA. 5. Biosynteza i jej kontrola genetyczna. 6. Właściwości immunogenne. 7. Lokalizacja ECA w komórce bakteryjnej i sposoby jego detekcji. 8. Rola biologiczna. 9. Zastosowanie. 10. Podsumowanie

ECA – common surface antigen of the bacilli of the *Enterobacteriaceae* family

Abstract: Almost all the strains of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family share at least one common antigenic component, ECA, which is not present in other Gram-negative and Gram-positive bacteria. From the observations made with immunofluorescence and immunoferritin techniques, it has been concluded that ECA is localized in the outer leaflet of the outer membrane of Gram-negative enteric bacteria. ECA is a glycolipid consisting of linear trisaccharide repeating units composed of [\rightarrow 3)- α -D-Fucp4NAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-ManpNAcA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow)]_n. It occurs in three structural forms: ECA_{PG} linked to phosphatidylglycerol, ECA_{LPS} anchored to LPS core region and ECA_{CYC} not expressed on the surface. ECA is believed to be connected to the LPS outer core. However, it should be emphasized that *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 mutants defective in outer core synthesis were also ECA-immunogenic. The genes involved in ECA biosynthesis are located in the chromosomal *wec* gene cluster, from *wecA* to *wecG* and the ECA expressions is downregulated at host temperature. So far, ECA has been thoroughly analyzed at the structural and genetic level, however, its significance *in vivo* has been investigated in relatively few studies. ECA has been linked to pathogenesis in several species of bacteria, although this function seems to differ between the species. ECA has been shown to be involved in the flagellar assembly and motility in *Serratia marcescens*. Also, the ECA-negative mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium proved to be significantly less virulent than the parental strain. ECA as a marker of *Enterobacteriaceae* family is a valuable indicator of water and food contaminations with enteric bacteria.

1. Discovery history. 2. Occurrence. 3. Chemical characterization. 4. Forms of ECA. 5. Genetics of ECA biosynthesis. 6. The immunogenic properties. 7. Localization of ECA in the bacterial cell and methods of its detection. 8. Biological significance. 9. Application. 10. Summary

Słowa kluczowe: ECA, *Enterobacteriaceae*, enterobakteryjny antygen wspólny

Key words: ECA, *Enterobacteriaceae*, enterobacterial common antigen

1. Historia odkrycia

W drugiej połowie ubiegłego stulecia badacze zwrócili szczególną uwagę na poszukiwanie antygenów wspólnych dla różnych gatunków bakterii, zarówno tych bezwzględnie patogennych jak i chorobotwórczych warunkowo (oportunistycznych), w kontekście potencjalnego wykorzystania ich w diagnostyce i profilaktyce chorób zakaźnych. Szczególne zainteresowanie wzbudził, odkryty w 1963 roku przez Calvina Kunina w pałeczkach rodziny *Enterobacteriaceae* antygen wspólny – CA (Common Antigen), nazwany później na cześć odkrywcy antygenem Kunina, a obecnie ECA (*Enterobacterial Common Antigen*, wspólny enterobakteryjny antygen). Kunin ujawnił jego obecność w czasie badań nad infekcjami układu moczowego powodowanymi przez różne szczepy *Escherichia coli*. Celem badań było wykrycie obecności przeciwciał anti-*E. coli* oraz badanie stopnia serologicznych reakcji krzyżowych pomiędzy różnymi serotypami O *E. coli*. W czasie badania naukowiec wykorzystywał zdolność 145 szczepów reprezentujących większość znanych O serotypów *E. coli* do opłaszczania erytrocytów (RBC),

celem umożliwienia im aglutynacji zarówno z wykorzystaniem surowicy homologicznej jak i heterologicznej. Nieoczekiwanie odkrył, że aglutynacja erytrocytów opłaszczonych wszystkimi badanymi serotypami *E. coli* miała miejsce nawet przy wykorzystaniu surowicy heterologicznej. Najwyższą krzyżową reaktywność wykazywały surowice odpornościowe *E. coli* O14, a także *E. coli* O56, O124 i O144. Krzyżowo reagujące przeciwciała można było usunąć z surowicy anti-*E. coli* O14 poprzez adsorpcję ekstraktem dowolnego szczepu *E. coli*, natomiast nadal w tej surowicy pozostawały przeciwciała reagujące ze szczepem homologicznym [32]. Na uwagę zasługuje również fakt, że rok przed Kuninem, Brodhage z pałeczek *Salmonella* wyekstrahował za pomocą mocznika, wspólny antygen, który nazwał antygenem „C” (*common*) [13]. Antygen ten wykazywał reaktywność z surowicami odpornościowymi uzyskanymi dla niespokrewnionych serologicznie pałeczek *Salmonella* oraz z surowicą anti-*Shigella sonnei*. Późniejsze badania, z użyciem monospecyficznych surowic anti-ECA dowiodły tożsamość antygeny „C” z ECA, którego obecna nazwa oddaje jego szeroką specyficzność dla pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae*.

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel: (32) 20 09 359; e-mail: magdalena.noszczyńska@us.edu.pl

2. Występowanie

Dalsze badania nad występowaniem ECA wykazały, że jest on obecny we wszystkich dzikich szczepach rodziny *Enterobacteriaceae*, podczas gdy inne Gram-ujemne oraz Gram-dodatnie bakterie go nie posiadają. Niemniej jednak znane są wyjątki, odbiegające od tej reguły [30]. Nie udokumentowano obecności ECA u jednego szczepu *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* i *Erwinia chrysanthemi* oraz u pojedynczych szczepów *Morganella morganii* i *Providencia rettgeri*.

Badania z użyciem przeciwciała monoklonalnego swoistego dla ECA (mAb 898) zaowocowały wykryciem niewielkich ilości ECA w traktowanych wysoką temperaturą supernatantach *Actinobacillus equuli* i *Actinobacillus suis*. Wyniki te nie zostały jednak potwierdzone analizami chemicznymi, które wykazały brak charakterystycznych składników ECA w obydwu gatunkach. Wykluczono także hipotezę, wykonując badania chemiczne lipopolisacharydów (LPS) tych szczepów, że reakcje krzyżowe z mAb 898, wynikają z istnienia ECA przyłączonego do lipopolisacharydu (tzw. ECA_{LPS}) [12].

Analiza chemiczna i serologiczna ECA wyizolowanego z *Plesiomonas shigelloides* należącego do rodziny *Vibrionaceae*, wykazała, że charakteryzuje się on identycznym składem chemicznym i właściwościami serologicznymi jak ECA pochodzący z enterobakterii [9]. Ostatecznie, na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych genomu tej bakterii, przeniesiono ten gatunek do rodziny *Enterobacteriaceae* [41].

Wartość ECA, jako dodatkowego kryterium taksonomicznego ilustruje jego obecność w gatunkach *Yersinia*, a brak w *Pasteurella haemolytica* i *Pasteurella multocida*, co było podstawą eliminacji rodzaju *Yersinia* z rodzaju *Pasteurella* i przeniesienia do rodziny *Enterobacteriaceae*, jako nowy rodzaj [11].

Wart podkreślenia pozostaje również fakt obecności ECA w *Tatumella ptyseos* i *Xenorhabdus*, ponieważ pałeczki tych dwóch rodzajów reprezentują nietypowych przedstawicieli *Enterobacteriaceae* [30].

Ilościowe badania porównawcze ECA prowadzone na ponad 184 szczepach ujawniły różnice w zawartości ECA, które wydają się być specyficznym ilościowym markerem mogącym posłużyć w diagnostyce różnych rodzajów i gatunków enterobakterii. Zróżnicowanie poziomu ECA w szczepach bakteryjnych można wykazać w teście zahamowania hemaglutynacji biernej. Ilość antygeny określano w umownych jednostkach inhibitorowych przypadających na ekstrakt, który uzyskiwano z miligrama suchej masy bakteryjnej. Najwyższą zawartość ECA wykazywały pałeczki *Shigella*, *Citrobacter* i *Enterobacter* (powyżej 200 jednostek na miligram), o połowę niższą pałeczki rodzaju *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia* i *Salmonella* (około 100 jednostek

na miligram), najniższą zaś, bo 0.4 do 70 jednostek na miligram stwierdzono w szczepach z rodzaju *Serratia*, *Proteus* i *Providencia* [25].

3. Charakterystyka chemiczna

Odkrycie wspólnego antygeny pałeczek jelitowych zapoczątkowało badania, których celem było uzyskanie czystego preparatu ECA, a następnie określenie jego struktury chemicznej. Bardzo istotne znaczenie miały badania przeprowadzone w 1978 roku przez Männel i Mayer'a, którzy wyizolowali ECA ze szczepu *Salmonella enterica* sv. Montevideo SH94. Badany antygen uzyskano dzięki połączeniu dwóch różnych metod ekstrakcyjnych, opracowanych wcześniej w celu izolacji lipopolisacharydów, tj. metody Westphala (ekstrakcja fenolowo-wodna na gorąco) oraz metody Galanosa (ekstrakcja mieszaniną fenol: chloroform: eter naftowy). Analiza chemiczna uzyskanego materiału wykazała, że jest on liniowym heteropolimerem złożonym z disacharydowych powtarzających się jednostek, które składają się z N-acetylo-D-glukozaminy (GlcNAc) i kwasu N-acetylo-D-mannozaminouronowego (ManNAcA) [39]. Odmierna struktura chemiczna ECA została natomiast przedstawiona przez Ługowskiego i Romanowską, którzy wyizolowali ECA ze szczepu *Shigella sonnei* 9773. Na podstawie przeprowadzonych badań strukturalnych wykazano, że antygen wspólny jest polimerem złożonym z trisacharydowych powtarzających się jednostek cukrowych, które utworzone są z dwóch cząsteczek ManNAcA i jednej cząsteczki GlcNAc, której reszty były nieekwimolarnie O-acytylowane [36]. Stwierdzono także, obecność niewielkiej ilości kwasów tłuszczowych. W 1983 roku zaproponowana wcześniej struktura chemiczna ECA, została zweryfikowana. Za pomocą nowej wówczas techniki – spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), wykazano obecność trzeciego składnika antygeny wspólnego, tj. N-acetylo-4-amino-D-fukozy (Fuc4NAc) [37]. Stąd, obecnie wiadomo, że ECA zbudowany jest z trisacharydowych powtarzających się jednostek o sekwencji: [\rightarrow 3)- α -D-Fuc₄NAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Man_pNAcA-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc_pNAc-(1 \rightarrow)]_n, które ulegają polimeryzacji tworząc polisacharyd ECA o różnej długości łańcucha [14, 23].

4. Formy ECA

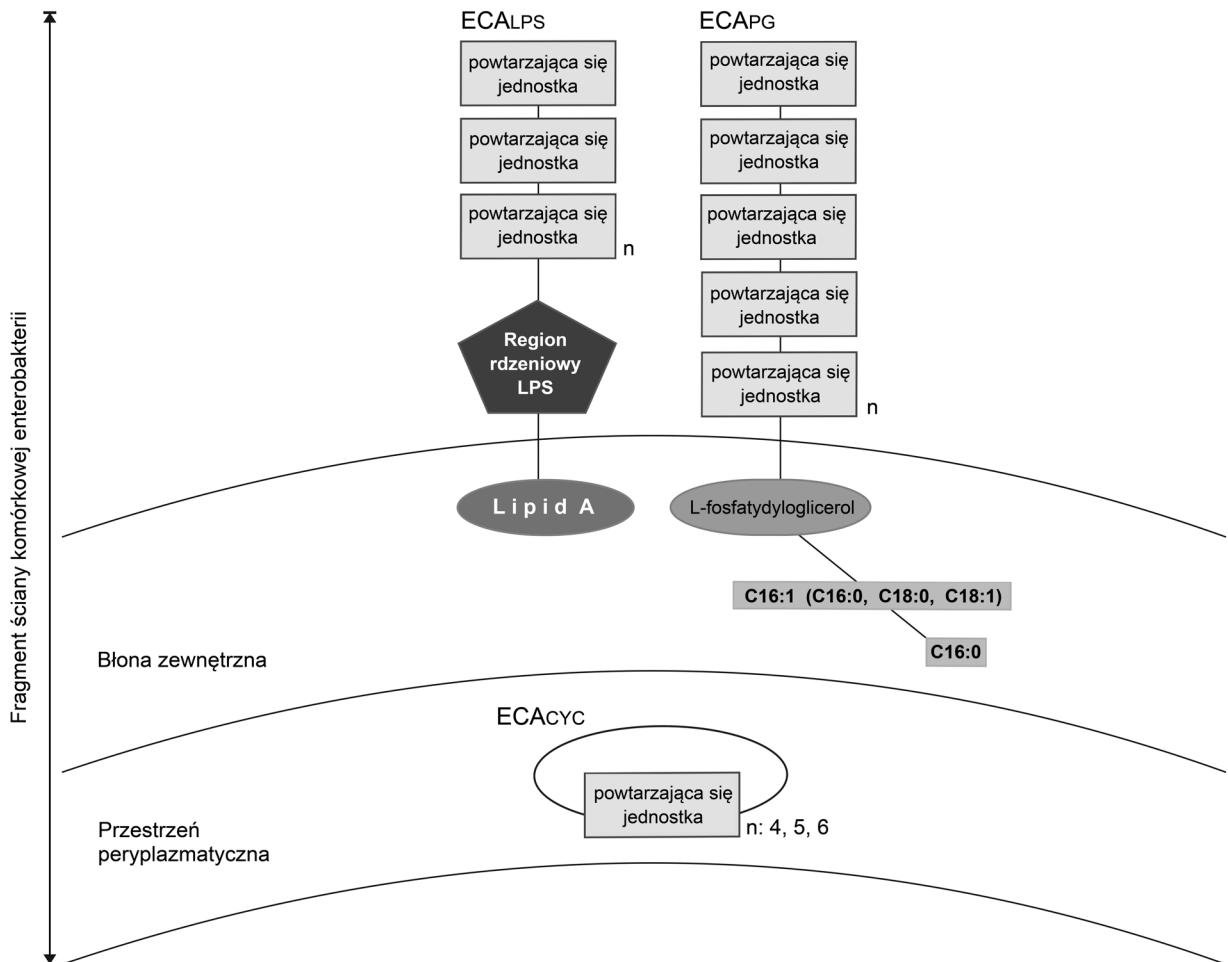
W obrębie pałeczek jelitowych stwierdzono występowanie trzech form ECA, określanych jako ECA_{PG}, ECA_{LPS} i ECA_{CYC}. Wszystkie formy ECA charakteryzują się obecnością części polisacharydowej. Różnią się natomiast pod względem obecności części lipidowej

lub jej brakiem, lokalizacji w komórce bakteryjnej oraz właściwościami immunogennymi (rys. 1) [14, 29].

ECA_{PG} to najlepiej poznana forma, która występuje u wszystkich przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*. Stanowi około 0,2% suchej masy komórki bakteryjnej. Część cukrowa antygeny związana jest kowalencyjnie za pomocą redukującego końca cząsteczki (GlcNAc) z resztą fosforanową L-fosfatydyloglicerolu (część lipidowa), do którego w pozycjach C-1 i C-2 za pomocą wiązania estrowego przyłączone są odpowiednie kwasy tłuszczowe [17, 23, 24, 28, 30]. Obecność komponentu lipidowego jest niezmiernie istotna, gdyż umożliwia zakotwiczenie ECA w obrębie błony zewnętrznej ściany komórkowej *Enterobacteriaceae*, dzięki czemu pełni on rolę antygeny powierzchniowego [9]. Jeżeli w wyniku traktowania fosfolipazą A₂ zostanie odłączony jeden kwas tłuszczowy lub gdy na skutek działania fosfolipazy D, nastąpi całkowite usunięcie wszystkich kwasów tłuszczowych z L-fosfatydyloglicerolu, wówczas ECA traci swoją zdolność do opłaszczania RBC, ale zachowuje antygenowość. Absolutne usunięcie kwasów tłuszczowych z molekuly ECA może następować także w przypadku działania

tzew. czynnika „*Pseudomonas Factor*” (PF). Czynniki ten produkowany jest przez *Pseudomonas aeruginosa* i wydaje się być egzoenzymem (lub mieszaniną egzoenzymów) działającym w obrębie części lipidowej ECA, który uwalnia wszystkie kwasy tłuszczowe, podobnie jak typowe lipazy. Również w tym wypadku skutkuje to utratą zdolności ECA do opłaszczania erytrocytów i tym samym zanikiem reaktywności z przeciwciałami anti-ECA w testach hemaglutynacji biernej, nie wpływa jednak na łańcuch cukrowy, odpowiedzialny za właściwości serologiczne antygeny wspólnego. Jak wykazano, już oddzielenie jednej reszty kwasu tłuszczowego skutkuje utratą charakterystycznego obrazu ECA przypominającego „skrzydła ptaka” w procesie immunoelektroforetycznym, jak i zdolnością do opłaszczania krwinek czerwonych [28]. ECA_{PG} nie wykazuje właściwości immunogennych, stąd nazywany jest także czasami „haptenowym” ECA, ponieważ nie stymuluje produkcji specyficznych przeciwciał, jeżeli nie jest związany z odpowiednim nośnikiem białkowym [9, 26, 30].

ECA_{LPS} jest formą immunogenną, która występuje równoległe z ECA_{PG} na powierzchni komórek bakteryjnych. Forma ta charakteryzuje się przyłączeniem



Rys. 1. Formy występowania ECA i ich lokalizacja w komórce bakteryjnej. Powtarzająca się jednostka: [->3)-α-D-Fucp4NAc-(1->4)-β-D-ManpNAc-(1->4)-α-D-GlcpNAc-(1->]

łańcucha węglowodanowego poprzez region rdzeniowy LPS do lipidu A [54]. Obecność ECA_{LPS} wykazano u pozbawionych łańcucha O-swoistego mutantów szorstkich (R) *E. coli* posiadających pełny region rdzeniowy LPS typu coli R1, R4 i K-12, a zatem zbudowany z rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego. Nie stwierdzono natomiast jego występowania u mutantów *E. coli* defektywnych w biosyntezie rdzenia zewnętrznego [30]. Dowiedziono, że jedynie kompletny region rdzeniowy LPS *E. coli* może służyć jako akceptor ECA. Ponadto, badania dotyczące innego przedstawiciela *Enterobacteriaceae*, tj. *P. mirabilis* potwierdziły, że ECA_{LPS} występuje wyłącznie u szczepów, które posiadają pełny region rdzeniowy LPS. Mutanty tej bakterii pozbawione rdzenia zewnętrznego nie produkowały ECA_{LPS} [15]. Wyjątek stanowi *Yersinia enterocolitica* serotypu O:3, gdzie ECA przyłączony jest do wewnętrznego regionu rdzeniowego LPS, a dokładnie do jednej z dwóch reszt kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo) [46, 49, 50]. Za pomocą analiz chemicznych wykazano kowalencyjne wiązanie pomiędzy ECA a LPS z fazy II *Shigella sonnei*, a tym samym udowodniono istnienie ECA_{LPS} [18].

ECA_{CYC} to szczególna forma ECA, która nie występuje na powierzchni komórki bakteryjnej, lecz zgromadzona jest w przestrzeni peryplazmatycznej, zlokalizowanej między błoną wewnętrzną i zewnętrzną ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Forma ta pozbawiona jest części lipidowej, co umożliwia jej rozpuszczalność w wodzie. Polisacharyd ECA_{CYC}, w przeciwieństwie do ECA_{PG} nie zawiera fosfoglicerydowego aglikonu, tworzy cykliczny węglowodan o masie 2,4 kDa w przypadku *E. coli* K-12 [16, 23]. Analiza strukturalna oczyszczonego preparatu cyklicznego ECA pochodzącego z *E. coli* K-12 wykazała, że składa się on z czterech trisacharydowych powtarzających się jednostek, zawierających od 0 do 4 grup O-acetylowych, które podobnie jak w przypadku ECA_{PG}, przyłączone są w pozycji C-6 GlcNAc. Dla porównania, ECA_{CYC} wyekstrahowany z *S. sonnei* fazy I zawiera od 4–6 trisacharydowych powtarzających się jednostek, a zatem stopień polimeryzacji molekuł cyklicznego ECA, pochodzącego z różnych Gram-ujemnych enterobakterii nie wydaje się być identyczny [23, 24]. Ponadto wykazano, że wiązanie glikozydowe znajdujące się pomiędzy ManNacA i GlcNAc może występować w więcej niż jednym stanie konformacyjnym. Cykliczna forma wspólnego enterobakteryjnego antygeny krystalizuje w dwóch charakterystycznych formach: jednej, przyjmującej całkowicie kwadratową strukturę i drugiej, o kształcie nieznacznie pochylonego rombu [4]. Cykliczna forma ECA, została wykryta w ekstraktach komórkowych otrzymanych z *S. sonnei* fazy I, *Yersinia pestis* i *P. shigelloides*, natomiast nie stwierdzono jej obecności w ekstrakcie komórkowym *P. aeruginosa*

[4, 23]. Dostępne dane sugerują, iż ECA_{CYC} może występować u wszystkich przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* [24].

5. Biosynteza ECA i jej kontrola genetyczna

Synteza antygeny wspólnego odbywa się po cytoplazmatycznej stronie błony wewnętrznej i przebiega w trzech etapach, z których każdy jest uzależniony od poprzedniego. Substratami w procesie biosyntezy ECA są odpowiednie aktywne formy cukrów. Dodawane są one sukcesywnie do endogennego lipidowego akceptora, jakim jest undekaprenylomonofosforan (Und-P) [6, 21].

Synteza ECA rozpoczyna się od utworzenia trisacharydowej powtarzającej się jednostki. W pierwszym etapie następuje transfer GlcNAc-1-fosforanu z UDP-GlcNAc na nośnik lipidowy (undekaprenylomonofosforan), w wyniku którego powstaje GlcNAc-P-P-undekaprenol, czyli tzw. lipid I, będący pierwszym lipidowym intermediatem. Proces ten katalizowany jest przez WecA, integralne białko błonowe, którego aktywność uzależniona jest od obecności jonów Mg²⁺ i zostaje zahamowana pod wpływem działania antybiotyku – tunikamycyny [6, 33]. W drugim etapie, ManNacA jest przenoszony z UDP-ManNacA na powstały wcześniej lipid I, dając ManNacA-lipid I, zwany także lipidem II. Ostatnim krokiem jest transfer Fuc4NAc z TDP-Fuc4NAc, co skutkuje powstaniem Fuc4NAc-lipid II (Fuc4NAc-ManNacA-GlcNAc-PP-Und), czyli lipid III. Fakt, iż biosynteza heteropolisacharydowego łańcucha ECA rozpoczyna się od utworzenia GlcNAc-P-P-undekaprenolu wydaje się potwierdzać, że GlcNAc jest końcowym redukującym aminocukrem. Geny odpowiedzialne za biosyntezę ECA w większości zlokalizowane są w obrębie klastra genów *wec*, dawniej zwanego *rfe-rff*. Oba wymienione klastry genów, tj. *rfe* i *rff* występują w obrębie chromosomu bakteryjnego, na 83 minucie w przypadku *Salmonella* i 85 minucie u *E. coli*. Sekwencje nukleotydowe klastra *wec* (14 kb) zawierają 12 otwartych ramek odczytu (tabela I) [6, 7, 21, 23, 40, 52, 54].

Utworzone molekuly lipid III stanowią punkt wyjścia do syntezy polimeru ECA i są następnie przenoszone do przestrzeni peryplazmatycznej z udziałem flipazy WzxE. W peryplazmie zachodzi proces polimeryzacji poszczególnych powtarzających się trisacharydowych jednostek ECA według mechanizmu tzw. „blokowej polimeryzacji”, który katalizowany jest przez produkt genu *wzyE*. Ponadto, w proces polimeryzacji ECA_{PG} zaangażowany jest także tzw. modulator długości łańcucha polisacharydowego, Wzz_{ECA}, który odpowiada za uzyskanie polimeru złożonego z od 1 do 14 powtarzających się jednostek. Białko Wzz_{ECA} w przypadku *E. coli* K-12 kodowane jest przez gen O349.

Tabela I
Funkcje klastra genów *wec* [6, 40, 43, 54]

Gen	Funkcja genetyczna
<i>wecA</i>	Synteza GlcNAc-transferazy biorącej udział w tworzeniu Lipidu I
<i>wecB</i>	Synteza UDP-GlcNAc-2-epimerazy uczestniczącej w syntezie UDP-ManNAcA
<i>wecC</i>	Synteza UDP-ManNAc-dehydrogenazy biorącej udział w syntezie UDP-ManNAcA
<i>wecG</i>	Synteza ManNAcA-transferazy biorącej udział w tworzeniu Lipidu II
<i>rmlB</i> _{ECA}	Synteza TDP-glukozooksydoreduktazy biorącej udział w tworzeniu dTDP-4-keto-6-deoksyglukozy
<i>rmlA</i> _{ECA}	Synteza TDP-glukozopirofosforylasy przekształcającej glukozo-1-fosforan w dTDP-glukozę
<i>wecD</i>	Synteza acetylotransferazy przekształcającej TDP-Fuc4NH ₂ w TDP-Fuc4NAc
<i>wecE</i>	Synteza transaminazy przekształcającej TDP-4-keto-4,6-dideoksy-glukozę w TDP-Fuc4NH ₂
<i>wecF</i>	Synteza Fuc4NAc-transferazy przenoszącej Fuc4NAc na Lipid II; tworzenie Lipidu III
<i>wzzE</i>	Regulacja długości łańcucha
<i>wzy</i>	Polimeryzacja ECA
<i>wzxE</i>	Translokacja ECA

Niewyjaśnionym pozostaje fakt, na jakiej drodze powstaje cykliczna forma ECA. Przypuszcza się, że cyklizacja może wymagać tworzenia wiązania O-glikozydowego, będącego wynikiem transferu redukującego końca GlcNAc z undekaprenylopirofosforanu wiążącego linearny łańcuch cukrowy, na nieredukujący koniec Fuc4NAc tego samego łańcucha. Nie wiadomo również, jak dochodzi do transferu łańcuchów polisacharydowych na fosfoglicerydowy aglikon, tworzenia ECA_{PG} oraz jego późniejszej translokacji do błony zewnętrznej [7, 21, 23, 24].

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że za przyłączenie grup O-acetylowych w pozycji C-6 GlcNAc w ECA_{PG} i ECA_{CYC} odpowiada O-acetylotransferaza będąca wewnątrz błonowym białkiem, które kodowane jest przez gen *wecH*. Nie są jednak znane szczegóły dotyczące reakcji katalizowanej przez *WecH* i nie wiadomo także, na jakim etapie składania łańcucha polisacharydowego ECA może zachodzić proces O-acetylacji za pośrednictwem tego enzymu. Wydaje się jednak, że rolę donora podstawników O-acetylowych w tym procesie pełni acetylo-CoA, a sama reakcja zachodzi podczas składania lipidu II po cytoplazmatycznej stronie błony wewnętrznej, przed translokacją z udziałem *WzxE* w poprzek błony wewnętrznej. Nie uzyskano jednak do tej pory żadnych danych eksperymentalnych, które mogłyby potwierdzić powyższe spekulacje [24].

W biosyntezę ECA zaangażowane są również geny należące do klastra *wba*, odpowiadające za powstawanie enzymów niezbędnych do syntezy łańcuchów O-swoistych LPS. Mutacje genów występujących w obrębie klastra *wba* prowadzą do zahamowania syntezy jednostek cukrowych O-antygeny, skutkuje to utworzeniem lipopolisacharydu zbudowanego wyłącznie z lipidu A i rdzenia, co umożliwia powstanie ECA_{LPS}. Biosynteza ECA_{LPS} wymaga także prawidłowego funkcjonowania

genów odpowiedzialnych za powstawanie kompletnego rdzenia LPS (klastr genów *waa*) oraz genu *waaL*, który koduje O-translokazę (*WaaL*) przenoszącą ECA na rdzeń LPS. Modulacja długości łańcucha ECA_{PG} z udziałem *Wzz*_{ECA} jest niezależna od działania *WaaL* [30]. Nieoczekiwanie wykazano u *Y. enterocolitica* serotypu O:3 obecność zarówno łańcucha O-swoistego jak i ECA_{LPS} przyłączonych do tej samej molekuly LPS. Niewyjaśnionym pozostaje fakt, czy komórka bakteryjna syntetyzuje wszystkie cząsteczki LPS zawierające ECA i O-antygen, czy też produkowane są molekuly posiadające albo ECA albo antygen O-swoisty [44]. W przypadku *Salmonella enterica* sv. Typhimurium do biosyntezy ECA oprócz genów *wec*, niezbędne jest także działanie wspomnianych genów *wba*, które związane są z regionem *his* (*his*-linked *wba* region). Dobrym przykładem jest gen *rmlA*, kodujący enzym: TDP-glukozo-pyrofosforylazę. Katalizuje on powstawanie TDP-glukozy, będącej prekursorem TDP-Fuc4NAc, donora reszty Fuc4NAc, która uczestniczy w biosyntezie ECA [35]. Pomimo opisanego powyżej procesu biosyntezy ECA, nie został on jednak jak dotąd wyczerpująco poznany.

6. Właściwości immunogenne

Wśród bakterii rodziny *Enterobacteriaceae*, wyróżnia się szczepy ECA-immunogenne i ECA-nieimmunogenne [30]. Pewne światło na immunogenność ECA rzuciła seria badań, w których materiałem wyjściowym były mutanty R. Dzięki wykonanym doświadczeniom, wykazano, że wysoce immunogenny szczep *E. coli* O14:K7, uważany za szczep gładki (syntetyzujący LPS zbudowany z lipidu A, pełnego regionu rdzeniowego i łańcucha O-swoistego), jest w rzeczywistości mutantem szorstkim. Skutkiem tego przypuszczano, że produkcja

LPS pozbawionego łańcucha O-swoistego jest warunkiem koniecznym dla ujawnienia się immunogenności antygeny Kunina. Stwierdzono także, że szczepienie zwierząt doświadczalnych zarówno żywymi jak i martwymi komórkami bakterii form gładkich, nie indukuje produkcji przeciwciał anty-ECA [27]. Przełomowym badaniem okazała się ekstrakcja surowych preparatów ECA 85% etanolem, dzięki której wykazano różnice pomiędzy ECA_{PG} a ECA_{LPS}. W przypadku szczepów ECA-nieimmunogennych (gładkich) otrzymano całkowite oddzielenie frakcji nierozpuszczalnej w etanolu zawierającej LPS od rozpuszczalnej frakcji ECA_{PG}. Z kolei szczepy ECA-immunogenne (szorstkie) obejmowały frakcję rozpuszczalną ECA_{PG}, a także frakcję nierozpuszczalną zawierającą LPS i ECA, którym okazał się być ECA_{LPS}, warunkujący ich immunogenność [30, 31]. Ważnym krokiem w zrozumieniu immunogenności ECA było odkrycie, że niektóre mutanty szorstkie *R. coli* i *Shigella* charakteryzowały się właściwościami ECA-immunogennymi, podobnie jak *E. coli* O14:K7. Zawiesiny tych mutantów, po zabiciu wysoką temperaturą były immunogenne, a większość ich ECA była nierozpuszczalna w etanolu. Właściwości te były jednak ograniczone do pewnych typów rdzeni LPS, oznaczanych jako R1, R4 i K-12. Immunogenność ECA zależy od chemotypu LPS mutantów szorstkich oraz od sposobu przygotowania zawiesiny bakteryjnej, którą szczepi się zwierzęta doświadczalne (ogrzewanie zawiesiny w różnej temperaturze, działanie czynnikami chemicznymi). Badając właściwości immunogenne szczepu *E. coli* O14:K7 i mutantów *E. coli* o typie części rdzeniowej R1, stwierdzono, że szczepy te stymulują wytwarzanie przeciwciał anty-ECA, jeśli wprowadzono je w postaci supernatantu hodowli lub ogrzewanych zawiesin. Szczepionki z innych szczepów, sporządzone w analogiczny sposób, zawierały nieimmunogenny antygen ECA o tej samej swoistości serologicznej. Te wyjątkowe cechy pierwszej z grup wymienionych szczepów oraz fakt, że alkalizacja preparatu ECA zwiększała jego powinowactwo do powierzchni krwinek czerwonych nasunęło wniosek, że determinanta antygenowa ECA jest albo częścią LPS albo tworzy z nią silnie związany kompleks [19]. W tym drugim przypadku silne powiązanie z lipopolisacharydem mogłoby tłumaczyć fakt, iż immunogenność ECA nie obniża się w czasie ogrzewania [27]. Immunogenność ECA_{PG} jest zachowana kiedy to frakcja etanolo-rozpuszczalna i frakcja etanolo-nierozpuszczalnego LPS są oddzielnie wstrzyknięte temu samemu zwierzęciu [30]. Jednak z drugiej strony ten sam ECA_{PG} podany razem z LPS, traci charakter immunogenu. Zjawisko to nazwane zostało „immunosupresją związaną z antygenem”. Podobny wpływ na właściwości immunogenne ECA wywiera także lipid A, kardiolipina, Triton X-100, Tween-20 i gangliozidy [45]. Supernatant kultury *P. aeruginosa*

zawiera wspomniany wcześniej czynnik PF, który modyfikuje resztę lipidową ECA_{PG}. Inkubacja ECA_{PG} z tym czynnikiem powoduje zniszczenie jego immunogenności, podczas gdy na immunogenność ECA_{LPS} nie wywiera on żadnego wpływu [51]. Ze względu na małą masę molekularną, ECA może być immunogenny tylko wtedy gdy jest związany kowalencyjnie z nośnikiem: z LPS w przypadku ECA_{LPS} lub z białkami w przypadku ECA_{PG} [30]. ECA_{PG} zasocjowany z proteinami jest zdolny do indukcji przeciwciał jeśli jest wstrzyknięty dożylnie królikom [38]. Pomimo tego, że ECA_{LPS} produkowany był tylko przez mutanty R typu coli R1, R4 i K-12 syntetyzujące pełny region rdzeniowy, to jego obecność wykazano u mutantów szorstkich *Y. enterocolitica* O:3 pozbawionych rdzenia zewnętrznego. Dowiedziono, iż ECA w badanych mutantach R *Y. enterocolitica* O:3 przyłączony był do wewnętrznego regionu rdzeniowego LPS. Ponadto udowodniono, że ekspresja ECA w badanych mutantach zależy od temperatury i była efektywniejsza w 22°C niż w 37°C [44, 46, 48, 49, 50].

Obecność przeciwciał anty-ECA klasy IgG zaobserwowano również u zdrowych, dorosłych ludzi. Tak wysoka częstość występowania tych przeciwciał jest zapewne uwarunkowana ciągłym kontaktem organizmu człowieka z przedstawicielami rodziny *Enterobacteriaceae* zasiedlającymi przewód pokarmowy. Przeciwciała swoiste dla ECA wykrywano najczęściej i w najwyższym mianie w przypadku osób chorujących na zapalenie stawów [53].

7. Lokalizacja ECA w komórce bakteryjnej i sposoby jego detekcji

Związany z komórką bakteryjną ECA charakteryzował się dobrą reaktywnością z monoswoistą surowicą, co wykazano w teście biernej hemaglutynacji, a także w innych technikach serologicznych tj.: bierna hemoliza, zahamowanie biernej hemaglutynacji lub biernej hemolizy oraz immunoprecypitacja. Fakt ten przemawiał za obecnością tego antygeny na powierzchni bakterii, co potwierdziły wyniki uzyskane przez wielu badaczy [30]. W 1980 roku, Rinno i wsp. przeprowadzili badania nad rozmieszczeniem ECA w komórkach mutantów R *E. coli*, stosując technikę immunofluorescencji i frakcję immunoglobulin G znakowanych ferrytyną. Okazało się, że ECA-immunogenne szczepy *E. coli* (F470, F2387) znakowały się silniej niż szczepy ECA-nieimmunogenne (F614). Mutanty ECA-ujemne (F1283, F1327) nie reagowały z IgG znakowanymi ferrytyną. Komórki szczepu F470 wykazywały wysoką fluorescencję na całej swojej powierzchni, podczas gdy na powierzchni komórek szczepu *E. coli* F614 obserwowano tylko nieliczne skupiska fluorescen-

cyjne. W przypadku szczepów *E. coli* ECA-ujemnych nie zaobserwowano żadnej fluorescencji. Otrzymane wyniki wskazywały na lokalizację ECA w membranie zewnętrznej, a także sugerowały zdecydowanie lepszą ekspozycję ECA w szczepach ECA-immunogennych (zawierających oprócz ECA_{PG}, także ECA_{LPS}) niż w szczepach ECA-nieimmunogennych (zawierających tylko ECA_{PG}) [55]. Badania, techniką „whole mount” z użyciem znakowanych złotem lub ferrytyną przeciwciał drugorzędowych nad rozmieszczeniem ECA (ECA_{PG}, ECA_{LPS}) na powierzchni bakterii podjął w 1986 roku Acker i wsp. Dwa lata później, badacze ci poszukiwali lokalizacji ECA w membranie lub cytoplazmie komórki, stosując technikę mikroskopii elektronowej z użyciem znakowanych złotem przeciwciał drugorzędowych [1].

Otrzymane rezultaty badań nad topologią ECA w komórce bakteryjnej można podsumować w następujący sposób:

- 1) ECA jest składnikiem błony zewnętrznej wszystkich jak dotąd zbadanych pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae* [2].
- 2) Komórki szczepów, które oprócz ECA_{PG}, zawierają dodatkowo ECA_{LPS}, wykazują gęste, regularne znakowanie ferrytyną lub złotem [2].
- 3) Komórki szczepów, które zawierają tylko ECA_{PG}, charakteryzują się punktowym znakowaniem mniejszej gęstości [2].
- 4) Pozbawione otoczki szczepy *E. coli* wykazują wyraźnie lepszą gęstość znakowania [2].
- 5) W formach S pałeczek *Y. enterocolitica* O:3, np. szczepie Ye75S, ECA_{PG} jest zakotwiczony w membranie zewnętrznej i całkowicie przykryty przez łańcuchy O-antygeny. Wcześniejsze badania (techniką SDS/PAGE) przeprowadzone dla LPS tego szczepu wykazały, że kiedy szczep ten hodowano w temperaturze 40°C, następował znaczący wzrost liczby niepodstawionych przez O-antygen odcinków rdzenia. Rezultaty te pozostawały w zgodzie z faktem, że całkowite znakowanie było obserwowane na mikroskopach, tylko wtedy, gdy komórki hodowane były w 40°C, podczas, gdy w tych hodowanych w 22°C nie obserwowano znakowania ferrytyną. Na podstawie tych wyników wywnioskowano, że w komórkach Ye75S hodowanych w 22°C O-antygen całkowicie przykrywał ECA, natomiast w komórkach hodowanych w 40°C, kiedy wzrastał poziom LPS typu szorstkiego, ECA był znacznie lepiej dostępny dla przeciwciał. Przedstawione powyżej wyniki korespondowały z rezultatami otrzymanymi dla mutantu Ye75R z niekompletnym regionem rdzeniowym, w przypadku którego zaobserwowano gęste znakowanie ferrytyną. Rezultaty te wyjaśniały brak aglutynacji bakterii form S z surowicami anti-ECA, podczas gdy, miało to miejsce dla mutantów R [3].

- 6) Badania, z użyciem dwóch różnych przeciwciał monoklonalnych (jednego przeciwko ECA i drugiego przeciwko antygenowi K1 *E. coli*) techniką podwójnego znakowania i obserwacji w mikroskopie elektronowym wykazały, że znakowane złotem ECA znajdowało się w bliskim sąsiedztwie błony zewnętrznej, natomiast znakowanie specyficzne dla antygeny K1 obserwowano znacznie dalej od brzegu błony zewnętrznej, co sugeruje, że ECA nie zawsze dociera do najbardziej zewnętrznych warstw osłon komórki [1].

Przedstawione rezultaty badań nad topologią ECA w komórce bakteryjnej mogą tłumaczyć złożony problem ECA – immunogenności. ECA kowalencyjnie przyłączony do rdzenia LPS typu R czyli ECA_{LPS} jest wysoce immunogeny i zarazem dobrze eksponowany na powierzchni bakterii. Ekspozycja ECA_{PG} w formach S bakterii oraz mutantach R jest znacznie słabsza, dlatego też taka forma ECA charakteryzuje się niską immunogennością lub nawet jej brakiem, w przypadku immunizacji królików zabitymi ogrzewaniem komórkami bakteryjnymi [30].

8. Rola biologiczna

Niewiele wiadomo o znaczeniu ECA dla komórki bakteryjnej. Liczni przedstawiciele rodziny *Enterobacteriaceae* należą do mikroorganizmów patogennych dla człowieka, zwierząt i roślin, dlatego też dopatrywano się udziału ECA w zjadliwości tych bakterii. Szczepy *S. enterica* sv. Typhimurium zawierające ECA są 10 razy bardziej wirulentne niż szczepy ECA-ujemne, ponadto są bardziej odporne na działanie soli kwasów żółciowych po doustnej infekcji myszy [30, 52]. Sugeruje się także, że proces chorobowy u genetycznie podatnych osobników cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów może być potęgowany przez ECA. Hipoteza ta nie została jednak jak dotąd poparta badaniami eksperymentalnymi [5]. Wykazano także, że ECA warunkuje oporność szczepu *E. coli* O157:H7 na kwasy organiczne i tym samym umożliwia przeżycie tych bakterii w obrębie przewodu pokarmowego gospodarza [8, 4, 17]. Przypuszcza się, że ECA, podobnie jak LPS, może pełnić rolę powierzchniowo-aktywnego składnika, który ułatwia poruszanie się *E. coli* K-12 ruchem *swarming* na agarze miękkim, za sprawą obniżania napięcia powierzchniowego [22]. Dowiedziono także, że zakłócenie drogi biosyntezy ECA może powodować zaburzenia w zdolnościach poruszania się komórek *Serratia marcescens* i to zarówno w odniesieniu do ruchu *swarming*, jak i *swimming*. Ten pierwszy jest skoordynowanym przemieszczaniem się ściśle związanej grupy bakterii w podłożu stałym lub półpłynnym, podczas gdy ruch typu *swimming* to chemotaktyczna

translokacja pojedynczych komórek bakterii w środowisku płynnym. Ponadto, sugeruje się, że ECA pełni istotną rolę w integralności i/lub stabilności osłony komórkowej pałeczek *Enterobacteriaceae* [14]. Obdarzony ładunkiem ujemnym antygen wspólny, podobnie jak region Kdo lipopolisacharydu, może odgrywać znaczącą rolę w wiązaniu kationów do powierzchni komórki [30]. Wydaje się także prawdopodobnym, że wpływa na bilans wapnia w komórce bakteryjnej, gdyż jak wykazano, ECA pochodzący z *Salmonella enterica* sv. Montevideo wiąże jony Ca^{2+} w ilości prawie dziesięciokrotnie wyższej aniżeli jony Mg^{2+} [8].

Wiedza na temat funkcji jaką pełni ECA_{CYC} jest dosyć nikła. Peryplazmatyczna lokalizacja i cykliczna struktura tej formy antygeny są podobne do tych, które cechują osmoregulacyjne peryplazmatyczne glukany, syntetyzowane przez wiele Gram-ujemnych *Proteobacteria*. Nie mniej jednak, synteza ECA_{CYC} nie wydaje się być związana z procesami osmoregulacyjnymi [24]. Wykazano natomiast oddziaływanie ECA_{CYC} z lektyną wiążącą mannozę (MBL) [47]. MBL jest ważnym czynnikiem odporności wrodzonej, biorącym udział w zwalczaniu infekcji przez wzmaganie fagocytozy, lizę mikroorganizmów lub modulację odpowiedzi gospodarza na wzorce molekularne związane z patogenem (PAMP) [56]. Sugeruje to udział ECA_{CYC} w indukcji reakcji zapalnych gospodarza.

Podsumowując, należy zwrócić uwagę na to, iż pomimo pewnego związku występowania ECA z właściwościami patogennymi bakterii, funkcja antygeny wspólnego wydaje się być zróżnicowana w zależności od gatunku. Chociaż ECA jest obecny u wielu bakterii, każdy gatunek mógł wykształcić unikalne, właściwe sobie drogi wykorzystania tego składnika, co sprzyja przeżyciu poszczególnych gatunków w niszach jakie zajmują [17].

9. Zastosowanie

ECA, jako składnik charakterystyczny dla przedstawicieli *Enterobacteriaceae* znajduje zastosowanie w diagnostyce. Pałeczki jelitowe należące do tej rodziny, jak np. gatunki z rodzajów *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella* czy *Shigella* często stanowią zanieczyszczenie wyrobów spożywczych i farmaceutycznych, powodując w efekcie poważne zatrucia pokarmowe. Dlatego, tak ważna jest kontrola zakażeń tymi bakteriami wyżej wymienionych produktów. Ważną metodą identyfikacji tych bakterii są techniki immunochemiczne z zastosowaniem specyficznego dla ECA przeciwciała monoklonalnego [34]. Technika ELISA z zastosowaniem komercyjnego przeciwciała monoklonalnego mAb G2a 898, skierowanego swoiście przeciwko ECA, umożliwia identyfikację enterobak-

terii w wodzie pitnej [20]. Wspólny enterobakteryjny antygen pozwala także na wykrywanie pałeczek *Enterobacteriaceae* z zastosowaniem metod molekularnych. W tym celu zaprojektowano oligonukleotydowe startery dla opartej na reakcji PCR detekcji klastra genów *wec*, który odpowiada za biosyntezę ECA. Spośród trzech zaprojektowanych starterów: *wecA*, *wecE* i *wecF*, primer *wecA* był specyficzny dla *E. coli*, podczas gdy, primery *wecE* i *wecF* umożliwiały detekcję większości gatunków należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. Przeprowadzanie reakcji PCR z użyciem wymienionych wyżej starterów pozwala na specyficzną identyfikację istotnych enterobakteryjnych patogenów jak: *E. coli* O157:H7, *Shigella* sp., *Salmonella* sp. i *Yersinia* sp. we krwi, moczu, jak i w wodzie pitnej [10].

10. Podsumowanie

Wspólny enterobakteryjny antygen (ECA) obecny jest prawie u wszystkich przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*, stanowiąc ich swoisty tatuaż. Jego powszechna obecność u enterobakterii zaowocowała wykorzystaniem go w licznych, szybkich testach z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla ECA, pozwalających określić jakość wody pitnej czy żywności. Poza tym, jej czystość można oceniać również stosując metodę PCR z wykorzystaniem oligonukleotydowych primerów flankujących klastr genów *wec* zawiadujących biosyntezą ECA. Ten aspekt praktyczny antygeny ECA wpływa z osiągnięć badań podstawowych dotyczących jego natury, prowadzonych głównie na pałeczkach *E. coli* i *Salmonella*. Badania te wyjaśniły budowę chemiczną ECA i jego strukturę. Antygen wspólny występuje w trzech strukturalnych formach: ECA_{CYC} , ECA_{PG} i ECA_{LPS} . ECA_{PG} kotwiczy w błonie zewnętrznej ściany komórkowej za pomocą L-fosfatydyloglicerolu. ECA_{LPS} związane jest z oligosacharydowym rdzeniem lipopolisacharydu, który przez lipid A kotwiczy ECA_{LPS} w błonie zewnętrznej. ECA_{CYC} jest cyklicznym polimerem, pozbawionym części lipidowej, zlokalizowanym w przestrzeni peryplazmatycznej ściany komórkowej. Tylko forma ECA_{LPS} wywołuje w makroorganizmie powstawanie swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko jego części wielocukrowej. Niemniej jednak wykazano, że mutanty szorstkie *Y. enterocolitica* serotypu O:3 pozbawione rdzenia zewnętrznego, były również ECA-immunogenne. Pomimo unikalnego występowania ECA w rodzinie *Enterobacteriaceae* jego biologiczna rola nie jest dobrze udokumentowana. Sugerowano, że ECA odgrywał rolę w patogenności bakterii poprzez wykazanie, że ECA-dodatnie mutanty *S. enterica* sv. Typhimurium były 10 razy bardziej wirulentne niż szczepy ECA-ujemne. Wskazywano również na ochronną funkcję ECA

w przeżywaniu bakterii *E. coli* O157:H7 w warunkach stresu środowiskowego. Uważa się, że najprawdopodobniej rola biologiczna ECA jest zróżnicowana w zależności od gatunku bakterii.

Piśmiennictwo

- Acker G.: Immunoelectron microscopy of surface antigens (polysaccharides) of Gram-negative bacteria using pre- and post-embedding techniques. *Method Microbiol.* **20**, 147–174 (1988)
- Acker G., Schmidt G., Mayer H.: Accessibility of Enterobacterial Common Antigen to antibodies in Encapsulated and Non-encapsulated S and R Forms of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1577–1583 (1982)
- Acker G., Knapp W., Wartenberg K., Mayer H.: Localization of Enterobacterial Common Antigen in *Yersinia enterocolitica* by the Immunoferritin Technique. *J. Bacteriol.* **147**, 602–611 (1981)
- Andersson A., Ahl Å., Eklund E., Widmalm G., Måler L.: Dynamics in the cyclic Enterobacterial common antigen as studied by ¹³C NMR relaxation. *J. Biomol. NMR.* **31**, 311–320 (2005)
- Aoki S., Yoshiwa K., Yokoyama T., Nonogaki T., Iwasaki S., Mitsui T., Niwa S.: Role of enteric bacteria in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: evidence for antibodies to enterobacterial common antigens in rheumatoid sera and synovial fluids. *Ann. Rheum. Dis.* **55**, 363–369 (1996)
- Barr K., Rick D.: Biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 7142–7150 (1987)
- Barr K., Klena J., Rick D.: The Modality of Enterobacterial Common Antigen Polysaccharide Chain Lengths Is Regulated by *wecA* by *wec* Gene Cluster of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **181**, 6564–6568 (1999)
- Barua S., Yamashino T., Hasegawa T., Yokoyama K., Torii K., Ohta M.: Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **43**, 629–640 (2002)
- Basu S., Kuhn H.M., Neszmelyi A., Himmelspach K., Mayer H.: Chemical characterization of enterobacterial common antigen isolated from *Plesiomonas shigelloides* ATTC 14029. *Eur. J. Biochem.* **162**, 75–81 (1987)
- Bayrdelle P., Zafarullah M.: Development of oligonucleotide primers for the specific PCR based detection of the most frequent *Enterobacteriaceae* species DNA using *wec* gene templates. *Can. J. Microbiol.* **48**, 113–122 (2002)
- Bercovier H., Mollaret K.H.: genus XIV. *Yersinia* (w) Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, red. N.R. Krieg, J.G. Holt, Williams and Wilkins, Baltimore, London, 1984, s. 498–506.
- Böttger E.C., Jürs M., Barret T., Wachsmuth K., Metzger S., Bitter-Suermann D.: Qualitative and quantitative Determination of Enterobacterial Common Antigen (ECA) with Monoclonal Antibodies: Expression of ECA by Two *Actinobacillus* Species. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 377–382 (1987)
- Brodhage H. Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. I. Harnstoff-Extrakte aus *S. typhi*, *paratyphi B*, *cholerae suis* und *Shig. sonnei*. *Z. Hyg.* **148**, 94–104 (1961)
- Castelli M.E., Vescovi E.G.: The Rcs Signal Transduction Pathway Is Triggered by Enterobacterial Common Antigen Structure Alterations in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **193**, 63–74 (2011)
- Duda K.A., Duda K.T., Beczała A., Kasperkiewicz K., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M.: ECA-immunogenicity of *Proteus mirabilis* strains. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **57**, 147–151 (2009)
- Erbel P.J.A., Seidel R., Macintosh S.E., Gentile L.N., Amor J.C., Kahn R.A., Prestegard J.H., McIntosh L.P., Gardner K.H.: Cyclic enterobacterial common antigen: Potential contaminant of bacterially expressed protein preparations. *J. Biomol. NMR.* **29**, 199–204 (2004)
- Gilbreath J.J., Dodds J.C., Rick P.D., Soloski M.J., Merrell D.S., Metcalf E.S.: Enterobacterial Common Antigen Mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Establish a Persistent Infection and Provide Protection against Subsequent Lethal Challenges. *Infect. Immun.* **80**, 441–450 (2012)
- Gozdziewicz T.K., Lugowski C., Lukaszewicz J.: First evidence for a linkage between Enterobacterial Common Antigen and lipopolysaccharide in *Shigella sonnei* phase II ECA_{LPS}. *J. Biol. Chem.* **289**, 2745–2754 (2014)
- Hammarström S., Carlsson H.E., Perlmann P., Svensson S.: Immunochemistry of the Common Antigen of *Enterobacteriaceae* (Kunin). *J. Exp. Med.* **134**, 565–576 (1971)
- Hübner I., Steinmetz I., Obst U., Giebel D., Bitter-Suermann D.: Rapid Determination of Members of the Family of *Enterobacteriaceae* in Drinking Water by an Immunological Assay Using a Monoclonal Antibody against Enterobacterial Common Antigen. *Appl. Env. Microbiol.* **58**, 3187–3191 (1992)
- Hung M., Rangarajan E., Munger C., Nadeau G., Sulea T., Matte A.: Crystal Structure of TDP-Fucosamine Acetyltransferase (WecD) from *Escherichia coli*, an Enzyme Requires for Enterobacterial Common Antigen Synthesis. *J. Bacteriol.* **188**, 5606–5617 (2006)
- Inoue T., Shingaki R., Hirose S., Waki K., Mori H., Fukui K.: Genome-Wide Screening of Genes Required for Swarming Motility in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **189**, 950–957 (2007)
- Kajimura J., Rahman A., Rick P.D.: Assembly of Cyclic Enterobacterial Common Antigen in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **187**, 6917–6927 (2005)
- Kajimura J., Rahman A., Hsu J., Evans M.R., Gardner K.H., Rick P.D.: O Acetylation of the Enterobacterial Common Antigen Polysaccharide Is Catalyzed by the Product of the *yiaH* Gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Microbiol.* **188**, 7542–7550 (2006)
- Kałużewski S., Czech Z.: Występowanie i zawartość antygenu Kunina (CAE) w pałeczkach *Enterobacteriaceae* oraz innych bakteriach Gram-ujemnych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **28**, 109–119 (1976)
- Kiss P., Rinno J., Schmidt G., Mayer H.: Structural studies on the Immunogenic Form of the Enterobacterial Common Antigen. *Eur. J. Biochem.* **88**, 211–218 (1978)
- Kotelko K.: Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych i jej antygenowe heteropolimery. *Post. Mikrobiol.* **15**, 29–49 (1976)
- Kuhn H.M., Neter E., Mayer H.: Modification of the Lipid Moiety of the Enterobacterial Common Antigen by the “*Pseudomonas* Factor”. *Infect. Immun.* **40**, 696–700 (1983)
- Kuhn H.M., Basu S., Mayer H.: Comparison of enterobacterial common antigen from different species by serological techniques. *Eur. J. Biochem.* **162**, 69–74 (1987)
- Kuhn H.M., Meier-Dieter U., Mayer H.: ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**, 195–222 (1988)
- Kuhn H.M., Meier U., Mayer H.: ECA – das gemeinsame Antigen der *Enterobacteriaceae* – Stiefkind der Mikrobiologie. *Forum Mikrobiol.* **7**, 274–285 (1984)
- Kunin C.M.: Separation, characterization, and biological significance of a common antigen in *Enterobacteriaceae*. *J. Exp. Med.* **118**, 565–586 (1963)
- Lehrer J., Vigeant K.A., Tatar L.D., Valvano M.A.: Functional Characterization and Membrane Topology of *Escherichia coli* WecA, a Sugar-Phosphate Transferase Initiating the Biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen and O-Antigen Lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **189**, 2618–2628 (2007)

34. Levasseur S., Husson M., Leitz R., Merlin F., Laurent F., Peladan F., Drocourt J., Leclerc H., Hoegaerden M.: Rapid detection of the Family *Enterobacteriaceae* by a Monoclonal Antibody. *Appl. Env. Microbiol.* **58**, 1524–1529 (1992)
35. Lew H.C., Mäkelä H., Kuhn H.M., Mayer H., Nikaido H.: Biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen Requires dTDP glucose Pyrophosphorylase Determined by a *Salmonella typhimurium rfb* Gene and *Salmonella montevideo rfe* Gene. *J. Microbiol.* **168**, 715–721 (1986)
36. Ługowski C., Romanowska E.: Enterobacterial Common Antigen: Isolation from *Shigella sonnei*, Purification and Immunochemical Characterization. *Eur. J. Biochem.* **91**, 89–97 (1978)
37. Ługowski C., Romanowska E., Kenne L., Lindberg B.: Identification of trisaccharide repeating unit in the enterobacterial common antigen. *Carbohydr. Res.* **118**, 173–181 (1983)
38. Ługowski C., Kulakowska M., Romanowska E.: Enterobacterial common antigen-tetanus toxoid conjugate as immunogen. *Infect. Immun.* **42**, 1086–1091 (1983)
39. Männel D., Mayer H.: Isolation and Chemical Characterization of the Enterobacterial Common Antigen. *Eur. J. Biochem.* **86**, 361–370 (1978)
40. Marolda C.L., Tatar L.D., Alaimo C., Aebi C., Valvano M.A.: Interplay of the Wzx Translocase and the Corresponding Polymerase and Chain Length Regulator Proteins in Translocation and Periplasmic Assembly of Lipopolysaccharide O Antigen. *J. Bacteriol.* **188**, 5124–5135 (2006)
41. Martínez-Murcia A.J., Benlloch S., Collins M.D.: Phylogenetic Interrelationships of Members of the Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequencing: Lack of Congruence with Results of DNA-DNA Hybridizations. *IJSEM.* **42**, 412–421 (1992)
42. Mayer H., Schmidt G.: Chemistry and biology of the enterobacterial common antigen (ECA). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **85**, 99–153 (1979)
43. Meier U., Mayer H.: Genetic location of genes encoding enterobacterial common antigen. *J. Bacteriol.* **163**, 756–762 (1985)
44. Muszyński A., Rabsztyń K., Knapska K., Duda K.A., Duda-Grychtoł K.T., Kasperkiewicz K., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M.: Enterobacterial common antigen and O-specific polysaccharide coexist in the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Microbiology*, **159**, 1782–1793 (2013)
45. Neter E., Whang H.Y.: The common antigen of Gram-negative bacteria (w) Cellular Antigens, red. A. Nowotny, Springer, Heidelberg, New York, 1972, s. 14–21
46. Noszczyńska M., Kasperkiewicz K., Duda K.A., Podhorońska J., Rabsztyń K., Gwizdała K., Świerżko A. St., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M.: Serological characterization of the enterobacterial common antigen substitution of the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Microbiology*, **161**, 219–227 (2015)
47. Paunova-Krasteva T.S., Pavlova V.A., De Castro C., Ivanova R.M., Molinaro A., Nikolova E.B., Stoitsova S.R.: Cyclic enterobacterial common antigens from *Escherichia coli* O157 as microbe-associated molecular patterns. *Can. J. Microbiol.* **60**, 173–176 (2014)
48. Rabsztyń K., Kasperkiewicz K., Duda K.A., Li C., Łukasik M., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M.: Characterization of Anti-ECA Antibodies in Rabbit Antiserum Against Rough *Yersinia enterocolitica* O:3. *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1016–1025 (2011)
49. Radziejewska-Lebrecht J., Kasperkiewicz K., Skurnik M., Brade L., Steinmetz I., Świerżko A.S., Muszyński A.: ECA-Antibodies in Antisera Against R Mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Adv. Exp. Med. Biol.* **529**, 215–218 (2003)
50. Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M., Shaskov A.S., Brade L., Różalski A., Bartodziejska B., Mayer H.: Immunochemical studies on R mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Act. Biol. Pol.* **45**, 1011–1019 (1998)
51. Ramia S., Neter E., Brenner J.: Production of Enterobacterial Common Antigen as an aid to Classification of Newly Identified Species of the Families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. *Inter. J. System. Bacteriol.* **32**, 395–398 (1982)
52. Ramos-Morales F., Prieto A.I., Beuzón C.R., Holden D.W., Casadesús J.: Role for *Salmonella enterica* Enterobacterial Common Antigen in Bile Resistance and Virulence. *J. Bacteriol.* **185**, 5328–5332 (2003)
53. Rastawicki W.: Humoralna odpowiedź na wybrane antygeny pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* w przebiegu jersiniozy u ludzi. III. Występowanie i poziom przeciwciał dla antygeny wspólnego pałeczek *Enterobacteriaceae* (ECA). *Med. Dosw. Mikrobiol.* **59**, 93–102 (2007)
54. Rick P.D., Mayer H., Neumeyer B.A., Wolski S., Bitter-Suermann D.: Biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen. *J. Bacteriol.* **162**, 494–503 (1985)
55. Rinno J., Golecki J.R., Mayer H.: Localization of enterobacterial common antigen: Immunogenic and nonimmunogenic enterobacterial common antigen-containing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **141**, 814–821 (1980)
56. Turner M.W.: The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol. Immunol.* **40**, 423–429 (2003)