

Received: 2012.04.13  
Accepted: 2012.06.06  
Published: 2012.06.26

## Wielofazowość antygenów rzęskowych u pałeczek *Salmonella*\*

### *Salmonella* multiphasic flagellar antigen

Grzegorz Madajczak

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

#### Streszczenie

U pałeczek *Salmonella* obserwuje się więcej niż jedną fazę antygenów rzęskowych, co jest uwarunkowane występowaniem jednego, dwóch lub trzech genów, które niezależnie od siebie kodują białko strukturalne witki rzęski o właściwościach antygenowych. Gen *fliC* koduje antygen rzęskowy pierwszej fazy, natomiast gen *fljB* – drugiej fazy. Trzecia faza antygeny rzęskowego związana jest z genem umiejscowionym na plazmidzie. Ekspresja genów *fliC* i *fljB* regulowana jest mechanizmem inwersji sekwencji fragmentu operonu *hinfljBA*. Gen *hin*, kodujący invertazę Hin, flankowany przez dwa regiony *hixL* i *hixR*, odwracany jest przez tetramer złożony z dimerów białek Hin i Fis. Proces ten włącza lub wyłącza ekspresję operonu *hinfljBA*. Kiedy operon podlega ekspresji (jest włączony) wytwarzane są białka strukturalne witki rzęski FljB oraz białko FljA, które jest potranskrypcyjnym inhibitorem ekspresji genu *fliC*. Oznacza to, że na powierzchni komórki pałeczki *Salmonella* mogą występować rzęski tylko pierwszej lub drugiej fazy. Czasem w wyniku mutacji w jednym z wymienionych genów, u bakterii dwufazowej dochodzi do unieczynnienia jednego z genów kodujących antygeny rzęskowe, w efekcie czego bakteria wytwarza antygen rzęskowy tylko jednej fazy (jednofazowe pałeczki *Salmonella*). W większości przypadków obserwuje się prawidłową ekspresję genu *fliC*. W Europie w ostatnich latach najczęściej występującą jednofazową postacią są pałeczki *Salmonella* o wzorze antygenowym 1, 4 [5], 12: i.

#### Słowa kluczowe:

*Salmonella* • antygen rzęskowy • faza antygenów rzęskowych • szczep jednofazowy • regulacja ekspresji

#### Summary

In the *Salmonella* antigenic pattern, more than one phase of flagellar antigen is observed. The phase of flagellar antigen depends of the gene which encodes the protein building the filament of flagella. The *fliC* gene encodes the 1<sup>st</sup> phase of flagellar antigen and the *fljB* gene encodes the 2<sup>nd</sup> phase of flagellar antigen. The third phase of flagellar antigen is encoded by one of the genes localized on the plasmid. Expression of the *fljB* gene (part of the *hinfljBA* operon) is regulated by a mechanism of DNA fragment sequence inversion. The *hin* gene, which encodes Hin invertase, flanked by two regions – *hixL* and *hixR* – is inverted by Hin invertase together with Fis protein. This process turns on or turns off of the *hinfljBA* operon. When this operon is turned on, FljB protein is produced (structural protein of flagella filament), and also FljA protein, which is a transcriptional repressor of the *fliC* gene. This means that one *Salmonella* cell could have only one phase flagellar antigen – 1<sup>st</sup> or 2<sup>nd</sup> phase. Sometimes, due to mutation in one of the mentioned genes, naturally diphasic *Salmonella* strains have the ability to produce only one phase of flagellar antigen. Mostly monophasic *Salmonella* with an active *fliC* gene are observed. In recent

\* Publikacja powstała w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, NN 404182940.



years such a strain, *Salmonella enterica* with the antigenic formula 1,4,[5],12: i: -, is one of the most often isolated strains from human cases in many European countries.

**Key words:** *Salmonella* • flagellar antigen • flagellar antigen phase • monophasic strain • regulation of expression

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1001631>

**Word count:** 2795

**Tables:** –

**Figures:** 3

**References:** 23

**Adres autora:** dr n. wet. Grzegorz Madajczak, Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: gmadajczak@pzh.gov.pl

**Wykaz skrótów:** **AFLP** – amplified fragments length polymorphism; **MLEE** – multilocus enzyme electrophoresis; **LPS** – lipopolisacharyd; **SSR** – site-specific DNA recombination; **WHO GFN** – Global Foodborne Infections Network.

## WSTĘP

Pałeczki *Salmonella enterica* subsp. *enterica* są drugim co do częstości patogenem bakteryjnym, wywołującym zakażenie przewodu pokarmowego. Zróżnicowanie antygenów somatycznych i rzęskowych występujących wśród przedstawicieli tego podgatunku, pozwoliło na wyodrębnienie ponad 1500 serologicznych typów o odmiennej strukturze antygenowej i zróżnicowanej chorobotwórczości dla ludzi i zwierząt [8].

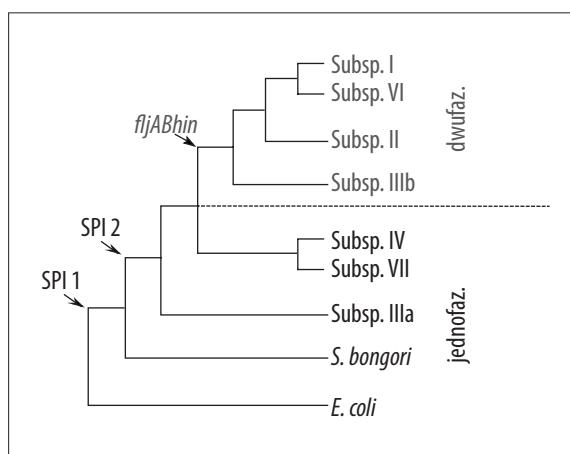
## ANTYGENY SOMATYCZNE PAŁECZEK *SALMONELLA*

Pałeczki *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ze względu na zróżnicowanie antygenów somatycznych zostały podzielone na grupy serologiczne (serogrupy), które początkowo określano kolejnymi dużymi literami alfabetu. Jednak wraz ze wzrostem liczby odkrywanych grup serologicznych zrezygnowano z zapisów literowych na rzecz oznaczeń cyfrowych – kolejnych numerów tzw. cząstkowych antygenów somatycznych charakterystycznych dla danej grupy, np. O: 4 dla grupy BO [8].

Antygen somatyczny pałeczek *Salmonella*, podobnie jak i u innych przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*, ma charakter łańcucha polisacharydowego wchodzącego w skład lipopolisacharydu (LPS) ściany komórkowej. Z antygenem tym związana jest cecha „szorstkości” szczepu bakteryjnego (tzw. faza R), spowodowana utratą części lub wszystkich ogniw łańcucha polisacharydowego. Fenotypowo objawia się to zwiększoną skłonnością do wystąpienia w zawieszynie tych drobnoustrojów autoaglutynacji.

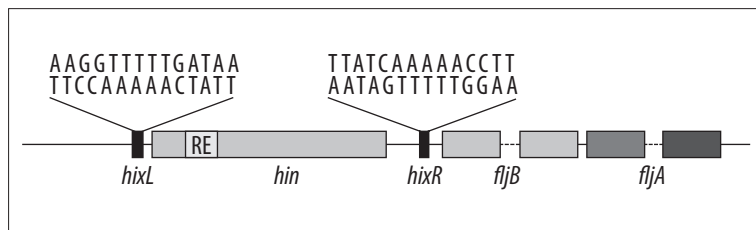
## ANTYGENY RZĘSKOWE PAŁECZEK *SALMONELLA*

Szczepy pałeczek *Salmonella* należące do tej samej grupy serologicznej, tj. o wspólnym cząstkowym antygenie somatycznym są różnicowane na poszczególne typy serologiczne ze względu na występowanie określonych antygenów rzęskowych. Antygeny te są białkami strukturalnymi włókna (filamentu) rzęski [8,11].

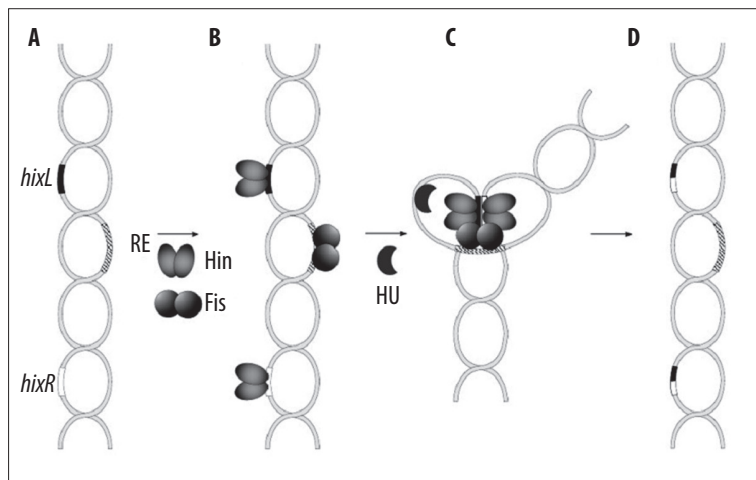


Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne pałeczek *Salmonella*, obrazujące podział na pałeczki jedno i wielofazowe [12]

Analizując strukturę antygenową pałeczek *Salmonella* wyróżnia się trzy fazy antygenów rzęskowych, za wytwarzanie których odpowiedzialne są geny umiejscowione w różnych miejscach genomu bakteryjnego. Jednak nie wszystkie pałeczki *Salmonella* wykazują trój-, czy bardziej powszechną dwufazowość antygenów rzęskowych. Przykładem szczepu, który wykazuje obecność trzeciej fazy antygenów rzęskowych jest *Salmonella* Typhi. Wśród przedstawicieli tego typu serologicznego notuje się występowanie różnych wariantów antygenów rzęskowych, w tym obecność antygeny trzeciej fazy oznaczonego symbolem „z66” [1]. Na podstawie wyników badań genomu pałeczek *Salmonella* metodą MLEE, jak i AFLP wykazano, iż cecha wielofazowości pojawiła się jako końcowy etap różnicowania się w obrębie gatunku [12]. Jednak nawet wśród przedstawicieli podgatunku I (*S. enterica* subsp. *enterica*), który jak wynika z analizy rozwoju filogenetycznego rodzaju *Salmonella* powinien grupować pałeczki, u których występują antygeny rzęskowe dwóch lub trzech faz, a także pałeczki wykazujące stałą cechę jednofazowości – brak antygenów rzęskowych jednej z faz [8].



Ryc. 2. Budowa operonu *hinfljBA*, z zaznaczeniem lewego (*hixL*) i prawego (*hixR*) miejsca odwróconych powtórzeń oraz miejscem stymulującym rekombinację (recombinational enhancer – RE), do którego wiąże się białko Fis [3,17]



Ryc. 3. Przebieg procesu inwersji sekwencji regionu zawartego pomiędzy *hixL* i *hixR*. (A) do rozpoczęcia procesu konieczne jest DNA w formie super zwiniętej. (B) do regionów *hixLR* przyłączają się białka Hin, do regionu RE białko Fis. (C) białko HU inicjuje zmianę konformacji przestrzennej DNA, z udziałem białek Hin i Fis. (D) w wyniku oddziaływania inwertazy Hin odwróceniu ulega sekwencja pomiędzy regionami

### GENY KODUJĄCE ANTYGENY RZĘSKOWE

Geny kodujące białka strukturalne włókna rzęski, mające właściwości antygenowe, znajdują się w dwóch lub trzech miejscach genomu komórki. Dwa pierwsze – kodujące antygeny rzęskowe I i II fazy, zlokalizowane są w obrębie chromosomu. Natomiast białko najrzadziej występującego antygeny rzęskowego III fazy kodowane jest przez gen występujący w obrębie DNA plazmidowego, np. *flpA* u trójfazowych wariantów *S. Rubislaw*, czy *fljB<sup>66</sup>* niektórych u *S. Typhi* [1,18]. Geny kodujące rzęski III fazy podlegają regulacji ekspresji niezależnej od regulacji ekspresji genów antygenów rzęskowych I i II fazy. W przypadku szczepów *S. Typhi* o wzorze antygenowym 9,12[Vi]: - : - : z<sub>66</sub>, za występowanie dodatkowego nietypowego antygeny odpowiedzialny jest gen *fljB<sup>66</sup>* umiejscowiony na plazmidzie. Gen ten jest odpowiednikiem genu *fljB*, kodującego białko strukturalne rzęsek II fazy, których brak, podobnie jak i genu u typowych przedstawicieli tego serotypu o wzorze antygenowym 9,12[Vi]: d: - [1,8].

Geny kodujące białka strukturalne antygenów rzęskowych I i II fazy znajdują się na chromosomie bakteryjnym w obrębie operonu *fli* – gen *fliC* (I faza) w miejscu 40' oraz operonu *flj* – gen *fljB* (II faza) – w miejscu 56' (ryc. 2, 3). Ekspresja obu genów podlega koregulacji, przy nadrzędnej roli operonu *flj*. W skład tego operonu wchodzi trzy geny: *hin* – kodujący białko biorące udział w regulacji ekspresji operonu *hinfljBA*, gen *fljB* oraz *fljA*. Ten ostatni koduje białko, które jest inhibitorem transkrypcji genu *fliC* [17].

Wspomniane uprzednio pałeczki należące do typu serologicznego *S. Typhi*, jak i wielu innych, np. *S. Reading*, *S. Bovismorbificans*, *S. Panama* charakteryzują się możliwością występowania antygeny rzęskowego w fazie R (szorstki antygen rzęskowy). Zbieżność nazwy z fenotypem R dla antygeny somatycznego wynika z podobnego

mechanizmu powstawania zjawiska. Polega ono na delecji, u niektórych szczepów, fragmentu genu kodującego dany antygen rzęskowy, co objawia się brakiem wybranych epitopów wchodzących w skład kompleksu antygenowego rzęski. W sekwencji genu *fliC* oraz *fljB* wyróżnia się początkowy obszar konserwatywny. W przypadku wspomnianych pałeczek *S. Typhi* zjawisko to polega na delecji fragmentu genu *fliC* o wielkości 261pz, co wywołuje zmianę fenotypu H: d na H: j [7]. Natomiast w przypadku niektórych szczepów należących do innych typów serologicznych, u których może występować „szorstkość” antygeny rzęskowego, obserwuje się dodatni wynik reakcji aglutynacji ze wszystkimi surowicami dla kompleksu antygenów rzęskowych I, np. surowicami H: 1,2, H: 1,5 itd. Brak jest jednak aglutynacji w surowicach dla antygenów cząstkowych H: 2, H: 5 itd. Również i w tym przypadku zjawisko to związane jest z delecją w obrębie genu kodującego antygen rzęskowy, lecz tym razem – II fazy – genu *fljB*. Antygen rzęskowy takich szczepów opisuje się symbolem „R1” [8].

### REGULACJA EKSPRESJI OPERONU *HINFLJBA*

Ekspresja operonu *hinfljBA* podlega kontroli na zasadzie zmiany orientacji sekwencji genu *hin* poprzez mechanizm swoistej miejscowo rekombinacji DNA – SSR. Zjawisko to polega na rozkręceniu superkolistego DNA i ponownym jego skręceniu w ten sposób, iż tworzą się pętle, powodujące wzajemne zbliżenie się, umiejscowionych w obrębie operonu *hinfljBA*, dwóch 14-nukleotydowych regionów *hixL* oraz *hixR* zawierających odwrócone powtórzenia (ryc. 2). To zaś doprowadza do rekombinacji tych regionów, czego następstwem jest zmiana orientacji sekwencji zawartej między regionami *hixL* i *hixR*.

W opisanym wyżej procesie (ryc. 3), bierze udział produkt genu *hin* – białko Hin, będące swoistą miejscowo



rekombinazą serynową (inwertazą) wiążącą się w postaci dimeru z DNA w regionach *hixLR* genu *hin*. Białko to wytwarzane jest na stałym konstytutywnym poziomie, co umożliwia zmianę orientacji genu *hin*, gdy znajduje się w orientacji niekodującej. Innym istotnym czynnikiem biorącym udział w procesie inwersji jest białko Fis – swoiście wiążące się z 65-nukleotydowym regionem stymulującym rekombinację (recombinational enhancer – RE), który znajduje się w odległości około 100 nukleotydów od regionu *hixL*. Utworzenie kompleksu białek złożonego z tetrameru Hin, dimeru Fis doprowadza do przecięcia nici DNA w obrębie regionów *hixLR* i rekombinacji poprzez skręcenia powstałej helisy typu E. W wyniku tego procesu zmienia się orientacja łańcucha DNA zawartego między regionem *hixL* i *hixR*, co doprowadza do włączenia lub wyłączenia genu *hin* [3].

„Włączony” gen *hin* umożliwia ekspresję znajdujących się w tej samej ramce odczytu dwóch kolejnych genów – *fljB* i *fljA*. Efektem tego jest wytwarzanie białka antygeny rzęskowego II fazy oraz białka FljA, które jest czynnikiem wybiórczo hamującym ekspresję genu *fliC*. Proces ten polega na łączeniu się białka FljA z mRNA genu *fliC*, co uniemożliwia jego translację i doprowadza do jego degradacji. Następuje zablokowanie wytwarzania białka FliC – budującego filament rzęski I fazy [11,23]. Powstające w tym samym czasie białko Hin przy następnym cyklu replikacji doprowadza do zmiany orientacji sekwencji genu *hin* i jego wyłączenia, co z kolei uniemożliwia ekspresję pozostałych genów, co skutkuje wytwarzaniem białka tworzącego włókno rzęski I fazy [3].

Sekwencje odwrotnie powtórzone (*hixLR*) znajdują się na zewnątrz od regionu kodującego białko, aczkolwiek wykazano, iż miejsce przyczepu rybosomów genu *hin* nakłada się z sekwencją *hixL* [17]. Mutacja w obrębie regionów *hixLR* nie wpływa na ekspresję genu *fljB*, jeśli sekwencja genu *hin* znajduje się w orientacji, gdy gen jest „włączony”. Badania nad sekwencją regionu podlegającego zmianie orientacji wykazały, iż zarówno miejsce wiązania rybosomów, jak i kodon start genu *fljB* znajduje się poza regionem oflankowanym przez regiony *hixL* i *hixR* [17]. Produkt ekspresji genu *hin* jest białkiem promotorowym dla genu *fljB*, które jak już wspomniano, jest białkiem strukturalnym włókna rzęski.

#### WYSTĘPOWANIE U PAŁECZEK *SALMONELLA* ANTYGENÓW RZĘSKOWYCH WIELU FAZ

Jak wynika z drzewa filogenetycznego pałeczek *Salmonella* (ryc. 1), zdolność do wytwarzania antygenów rzęskowych drugiej fazy została nabyta późno w toku rozwoju filogenetycznego rodzaju *Salmonella*. Zjawisko to wiąże się prawdopodobnie z rozszerzeniem przez pałeczki *Salmonella* zakresu gospodarzy. Nowa cecha – wielofazowość antygenów rzęskowych, umożliwiła adaptację bakteriom do zwierząt stałocieplnych [12,16]. U zwierząt zmienocieplnych pałeczki *Salmonella* stanowią naturalny składnik flory jelitowej. U zwierząt stałocieplnych pałeczki *Salmonella* w zależności od serotypu i gospodarza mogą być bakteriami chorobotwórczymi lub niechorobotwórczymi. Mechanizmem obrony gospodarza przed zakażeniem jest wytwarzanie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom drobnoustroju, np. antygenom rzęsek,

które są istotnym czynnikiem chorobotwórczości pałeczek *Salmonella*. Odpowiedzią pałeczek *Salmonella* było wykształcenie cechy „ucieczki antygenowej”, czyli zjawisko zmienności faz antygenów rzęskowych [12].

Według teorii McQuinstona i wsp. [12], dotyczącej dwufazowości pałeczek *Salmonella*, wykształcenie w toku ewolucji zdolności do wytwarzania rzęsek drugiej fazy pozwoliło tym drobnoustrojom na zajęcie nowej niszy ekologicznej w postaci nowych gospodarzy. Zdaniem tych autorów obecność w szczepie *Salmonella* antygenów rzęskowych tylko jednej fazy może ograniczać zdolność do wywołania zakażenia niektórymi pałeczkami *Salmonella* tylko do ściśle określonych gospodarzy. Na przykład mogą to być pałeczki *S. Typhi* – chorobotwórcze dla ludzi, czy pałeczki *S. Gallinarum* – chorobotwórcze dla kur [12]. Jednak zdaniem autora niniejszej pracy, teoria ta nie znajduje pełnego uzasadnienia. Dowodem na to jest wiele typów serologicznych pałeczek *Salmonella*, których przedstawiciele są naturalnie jednofazowi, tak jak *S. Enteritidis* (1,9,12: g,m: -), czy *S. Dublin* (1,9,12[Vi]: g,p: -), a także wiele innych szczepów izolowanych zarówno od człowieka jak i wielu gatunków zwierząt. Innym przykładem są pałeczki *S. Paratyphi B*, niezużywające do swego wzrostu winianu sodowo-potasowego (fenotyp winian -), u których stwierdza się obecność dwóch faz antygenów rzęskowych (1,4,[5],12: b: 1,5), a których chorobotwórczość jest ściśle ograniczona do ludzi, podczas gdy przedstawiciele tego serotypu o fenotypie winian (+) – *S. Paratyphi B* var. Java są izolowani od ludzi, jak i od przedstawicieli wielu gatunków zwierząt [6].

McQuinston i wsp. wykazują również, iż wykształcenie cechy wielofazowości antygenów rzęskowych przez pałeczki *Salmonella* może mieć związek z obroną tych drobnoustrojów przed ich naturalnymi wrogami, jakimi są niektóre pierwotniaki występujące w przewodzie pokarmowym zwierząt. Zmienność antygenowa oraz zmienna ruchliwość ma istotne znaczenie w obronie pałeczek *Salmonella* przed pierwotniakami, co wykazali Wildschutte i wsp. [22]. Baker i wsp. wykazali również, iż wykształcenie antygeny H: z66 zamiast H: d u pałeczek *Salmonella Typhi* może się raczej wiązać z oddziaływaniem pierwotniaków na te bakterie, niż układu immunologicznego człowieka [1].

#### JEDNOFAZOWOŚĆ PAŁECZEK *SALMONELLA*

Wśród pałeczek *Salmonella* z podgatunku I, II, IIIb i VI obserwuje się drobnoustroje, u których stwierdza się obecność antygenów rzęskowych dwóch lub nawet trzech faz, jak i bakterie, u których naturalnie występują antygeny tylko jednej fazy kodowane przez gen *fliC* [8]. W codziennej praktyce laboratoryjnej spotyka się również szczepy pałeczek *Salmonella*, u których nie można stwierdzić jednej z faz antygenów rzęskowych, mimo że należą do serotypu naturalnie dwufazowego. Częściej obserwuje się sytuację, gdy szczep wykazuje brak antygeny II fazy lub słabą reakcję aglutynacji w surowicy diagnostycznej dla tego antygeny. Zdecydowanie rzadziej obserwuje się analogiczną sytuację w odniesieniu do antygeny I fazy. Zjawisko to spowodowane jest różnicami w mechanizmach regulacji ekspresji genów kodujących antygeny obu faz. Regulacja ekspresji operonu *hinfljBA* jest procesem zależnym od wielu innych czynników, co sprawia iż łatwiej może dojść do



zaburzenia prawidłowego funkcjonowania tego procesu wskutek mutacji w jednym z uwikłanych genów. Ponadto nawet całkowite unieczynnienie operonu nie będzie miało takiego wpływu na funkcjonowanie komórki, jak miałyby w przypadku zmian w obrębie operonu *fli*. Ten bowiem, poza genem *fliC*, zawiera geny kodujące białka innych elementów strukturalnych rzęski. Mutacje w tych genach mogą doprowadzić do całkowitej blokady wytwarzania rzęsek, co zdecydowanie wpłynie na chorobotwórczość bakterii [11]. Można więc postawić tezę, jak zrobili to McQuinston i wsp., iż w genomie pałeczek *Salmonella*, geny kodujące białko strukturalne II fazy włókna rzęski znalazły się jako „koło zapasowe” właściwego mechanizmu kodowania strukturalnego białka I fazy rzęsek [12].

Przykładem jednofazowych wariantów pałeczek *Salmonella*, należących do naturalnie dwufazowych serotypów, mogą być pałeczki *Salmonella* o wzorze antygenowym 9,12: 1,v: - zaobserwowane na terenie Bułgarii, Danii i USA, opisane przez Petrova i wsp. [15]. Autorzy wraz z badaczami z wymienionych krajów, przeprowadzili analizy sekwencji genu *fljB* tych szczepów, a także inne badania porównawcze genomu. Pałeczki *Salmonella* o wzorze antygenowym 9,12: 1,v: - mogą należeć do 4 różnych typów serologicznych: S. Mendoza (9,12: 1,v: 1,2), S. Panama (9,12: 1,v: 1,5), S. Kapemba (9,12: 1,v: 1,7), S. Zaiman (9,12: 1,v: e,n,x) oraz S. Goettingen (9,12: 1,v: e,n,z15) [8]. Badania całkowitego DNA genomowego metodą PFGE nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie do jakiego typu serologicznego należą badane jednofazowe pałeczki *Salmonella*. Dopiero analiza sekwencji genu *fljB* wykazała, iż szczepy te mają gen, którego sekwencja jest w 100% zgodna z opublikowaną uprzednio sekwencją genu *fljB*, kodującego kompleks antygenowy H: e,n,z15 [13]. Pozwoliło to na stwierdzenie, iż szczepy te są jednofazowym wariantem pałeczek *Salmonella* Goettingen [15].

Analizując częstość występowania serotypów pałeczek *Salmonella* na terenie Europy, można stwierdzić, iż najczęściej występującym jednofazowym wariantem pałeczek *Salmonella* są te o wzorze antygenowym 1,4,[5],12: i: -. Zgodnie z danymi publikowanymi przez WHO GFN, pałeczki *Salmonella* o takim wzorze antygenowym znalazły się wśród 10 najczęściej występujących typów serologicznych pałeczek *Salmonella* izolowanych od ludzi w 2010 r. [21]. Pałeczki *Salmonella* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12: i: - stały się najczęściej izolowanym od ludzi typem serologicznym w Luksemburgu [14].

Pałeczki *Salmonella* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12: i: - jako szczep epidemiczny na terenie Europy zostały po raz pierwszy opisane przez Echeitę i wsp. [4]. W wyniku analizy sekwencji operonu *hinfljB*, a zwłaszcza sekwencji insercyjnej IS200 umiejscowionej w przestrzeni międzygenowej genów *fljB* i *fljA* stwierdzono, iż szczepy te są jednofazowym wariantem pałeczek *Salmonella* Typhimurium [5]. Badania przeprowadzone przez Soyera i wsp. z użyciem PFGE i MLST wykazały, iż szczepy pałeczek *Salmonella* o takim wzorze antygenowym, izolowane na terenie USA i Europy są niejednorodne pod względem genetycznym [19]. Podobne wyniki uzyskali Hopkins i wsp., badając szczepy pałeczek *Salmonella* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12: i: - izolowane od zwierząt i ludzi na terenie Europy [10]. Często szczepy te są nośnikami wyspy

genetycznej, odpowiedzialnej za zwiększoną oporność na leki przeciwbakteryjne [9,10,20].

Obecnie pałeczki *Salmonella* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12: i: - nazywane są czasem „*Salmonella* Typhimurium-like”, ze względu na brak możliwości odróżnienia ich od typowych, dwufazowych pałeczek *Salmonella* Typhimurium, a także innych typów serologicznych pałeczek *Salmonella* z grupy BO, z antygenem H: i w pierwszej fazie. Przepisy prawa europejskiego nakazują traktowanie takich szczepów jako *Salmonella* Typhimurium (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 517/2011).

#### LABORATORYJNA IDENTYFIKACJA ANTYGENÓW RZĘSKOWYCH

Oznaczając antygeny rzęskowe dwufazowego szczepu metodą aglutynacji szkiełkowej, z użyciem surowic monowalentnych, w populacji bakterii stanowiących pojedynczą kolonię, zwykle stwierdza się z tym samym nasileniem aglutynację antygenów obu faz. Jednak opisane wyżej mechanizmy regulujące ekspresję antygenów rzęskowych I i II fazy wykazują, iż na jednej komórce bakteryjnej występują antygeny rzęskowe tylko jednej fazy, tj. takie, których białko kodowane jest przez gen *fliC* lub gen *fljB* [2,11]. Stwierdzenie występowania w populacji bakterii antygenów rzęskowych obu faz jednocześnie, jest wynikiem obecności komórek bakteryjnych, u których aktywny jest gen kodujący antygen I fazy i komórek z aktywnym genem kodującym antygen II fazy, mniej więcej w stosunku 1:1.

Analizując zróżnicowanie antygenów rzęskowych pałeczek *Salmonella* można zauważyć, iż w wielu przypadkach dla jednej fazy stwierdza się występowanie kompleksu antygenów, np. kompleks G, do którego zalicza się antygeny G zawierające epitop „g”, takie jak: „g,m”, „f,g”, „g,z<sub>51</sub>” lub kompleks „1”, do którego zalicza się antygeny „1,2”, czy „1,5”. Wiadomo jednak, że mająca właściwości antygenowe flagellina, jest polimerem pojedynczego białka kodowanego przez jeden konkretny gen [11]. Oznacza to, iż występowanie kompleksów odpowiada obecności kilku epitopów w obrębie jednego antygeny, co ma bezpośrednie uzasadnienie w sekwencji genów kodujących antygeny rzęskowe. W sekwencji genu *fliC*, jak i *fljB* obserwuje się występowanie niezmienniej części konserwatywnej, odpowiadającej głównemu epitopowi np. „g”, oraz części zmiennej odpowiadającej pozostałym epitopom z danego kompleksu [13].

Wiedza na temat opisanego wyżej mechanizmu regulacji ekspresji genów kodujących antygeny rzęskowe, wykorzystywana jest w procedurze inwersji faz, kiedy to poprzez presję środowiska (obecność surowicy przeciw konkretnemu antygenowi rzęskowemu) selekcjonuje się populację bakterii tak, aby pozostały tylko te bakterie (lub ich znacząca przewaga), u których ekspresjonowany jest tylko gen jednej pożądanej fazy. W celu uzyskania inwersji faz rutynowo stosowany jest posiew na podłoże Garda z dodatkiem surowicy przeciwko antygenom, których ekspresję chce się zahamować. Istnieją dwie odmiany tej metody. Pierwsza z nich polega na posiewie szczepu na podłoże Garda na płytce o średnicy 5 cm i posiewie szczepu w centralnej części podłoża. Po rozejściu się szczepu na całą płytkę, pobiera się materiał z jej obrzeża. Powinien on zawierać bakterie, u których ekspresja danego antygeny uległa zahamowaniu. W przekonaniu autora, skuteczniejsza jest



druga odmiana metody, w której podłoże Garda z surowicą dla hamowanego antygeny wlewa się do probówki bakteriologicznej z zanurzoną rurką Craiga. Szczep do inwersji posiewa się do środka rurki, a po przejściu na zewnątrz rurki pobrany materiał będzie zawierać wyselekcjonowaną populację bakterii z ograniczoną ekspresją lub brakiem ekspresji jednego z antygenów rzęskowych, przeciwko któremu stosowana była surowica. Doświadczenie autora wykazuje, iż proces ten trzeba czasami powtarzać wielokrotnie, a do kolejnych pasażów dodawać co raz to większą objętość surowicy. Jednocześnie należy podkreślić, iż niemożliwy jest proces zahamowania ekspresji pojedynczego antygeny znajdującego się w kompleksie z innym antygenem. Nie jest możliwe zahamowanie ekspresji antygeny H: 1 tak, aby uzyskać ekspresję antygeny H: 5. Związane jest to z tym, iż oba antygeny są kodowane przez jeden

i ten sam gen. Zahamowanie ekspresji jednego, zahamuje również ekspresję drugiego.

## PODSUMOWANIE

Przedstawiona wiedza na temat molekularnych aspektów biosyntezy antygenów rzęskowych pałeczek *Salmonella* ma bezpośredni wpływ na jakość pracy laboratoryjnej wykonywanej celem określenia przynależności serologicznej badanego szczepu. Zrozumienie mechanizmów regulacji biosyntezy antygeny rzęskowego pozwala na dobór właściwej metody badania (np. inwersja faz na podłożu z surowicą dla konkretnego antygeny) oraz prawidłową interpretację uzyskanych wyników (szczepy jednofazowe, szczepy z szorstkim antygenem rzęskowym, czy też szczepy z innym antygenem, niż I lub II fazy).

## PIŚMIENICTWO

- [1] Baker S., Hardy J., Sanderson K.E., Quail M., Goodhead I., Kingsley R.A., Parkhill J., Stocker B., Dougan G.: A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella* Typhi. *PLoS Pathog.*, 2007; 3: e59
- [2] Bonifield H.R., Hughes K.T.: Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 3567–3574
- [3] Dhar G., Heiss J.K., Johnson R.C.: Mechanical constraints on Hin subunit rotation imposed by the Fis/enhancer system and DNA supercoiling during site-specific recombination. *Mol. Cell*, 2009; 34: 746–759
- [4] Echeita M.A.: Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:2 strain in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 1999; 37: 3425
- [5] Echeita M.A., Herrera S., Usera M.A.: Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39: 2981–2983
- [6] European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. W: EFSA J. EFSA, p. 22–107
- [7] Frankel G., Newton S.M., Schoolnik G.K., Stocker B.A.: Intragenic recombination in a flagellin gene: characterization of the H1-j gene of *Salmonella typhi*. *EMBO J.*, 1989; 8: 3149–3152
- [8] Grimont P.A., Weill F.X.: Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France. 2007
- [9] Guerra B., Soto S.M., Argüelles J.M., Mendoza M.C.: Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45: 1305–1308
- [10] Hopkins K.L., Kirchner M., Guerra B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczak A., Threlfall E.J., Mevius D.J.: Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill.*, 2010; 15: 19580
- [11] Macnab R.M.: Flagella and Motility. W: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, red.: Neidhardt F.C. Washington DC: ASM Press, 1996, p. 123–145
- [12] McQuiston J.R., Fields P.I., Tauxe R.V., Logsdon J.M. Jr.: Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol.*, 2008; 16: 142–148
- [13] McQuiston J.R., Parrenas R., Ortiz-Rivera M., Gheesling L., Brenner F., Fields P.I.: Sequencing and comparative analysis of flagellin genes fljC, fljB, and fljA from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42: 1923–1932
- [14] Mossong J., Marques P., Ragimbeau C., Huberty-Krau P., Losch S., Meyer G., Moris G., Strottner C., Rabsch W., Schneider F.: Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro Surveill.*, 2007; 12: E11–E12
- [15] Petrov P., Hendriksen R.S., Kantardjiev T., Asseva G., Sørensen G., Fields P., Mikoleit M., Whichard J., McQuiston J.R., Torpdahl M., Aarestrup F.M., Angulo F.J.: Occurrence and characterization of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar 9,12:1,v:- strains from Bulgaria, Denmark, and the United States. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2009; 28: 473–479
- [16] Porwollik S., Wong R.M., McClelland M.: Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 8956–8961
- [17] Simon M., Zieg J., Silverman M., Mandel G., Doolittle R.: Phase variation: evolution of a controlling element. *Science*, 1980; 209: 1370–1374
- [18] Smith N.H., Selander R.K.: Molecular genetic basis for complex flagellar antigen expression in a triphasic serovar of *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 956–960
- [19] Soyer Y., Moreno Switt A., Davis M.A., Maurer J., McDonough P.L., Schoonmaker-Bopp D.J., Dumas N.B., Root T., Warnick L.D., Gröhn Y.T., Wiedmann M.: *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J. Clin. Microbiol.*, 2009; 47: 3546–3556
- [20] Trüpschuch S., Laverde Gomez J.A., Ediberidze I., Flieger A., Rabsch W.: Characterisation of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i:- DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the thrW tRNA locus. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2010; 300: 279–288
- [21] WHO Global Foodborne Infections Network: GFN Country Databank. [http://thor.dfvf.dk/portal/page?\\_pageid=53,1&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://thor.dfvf.dk/portal/page?_pageid=53,1&_dad=portal&_schema=PORTAL) (15.05.2012)
- [22] Wildschutte H., Wolfe D.M., Tamewitz A., Lawrence J.G.: Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 10644–10649
- [23] Yamamoto S., Kutsukake K.: FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 958–967

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.