

UDK: 579.61 : 616-078

Pregledni rad

ANTIGENA SRODNOST GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJA SA POJAVOM CROSS REAKTIVNOSTI U SEROLOŠKIM REAKCIJAMA

*Krnjaić D., Ašanin Ružica, Plavšić Budimir **

Izvod: Kao dopunske ili alternativne metode klasičnoj izolaciji i determinaciji infektivnih agenasa koriste se i različiti serološki testovi. U ispitujućim uzorcima krvnih seruma određuje se prisustvo specifičnih antitela protiv antigena određenih uzročnika. Specifičnost reakcije in vivo i in vitro zavisi od determinantnih grupa (epitopa) na molekulima antigena i odgovarajućih aktivnih mesta na molekulima antitela. Zbog prisustva hemijski identičnih ili sličnih struktura polisaharidne ili polipeptidne prirode u omotačima bakterija i flagelama postoje srodni antigeni između više vrsta bakterija. Ovi srodni antigeni kod različitih vrsta nazivaju se heterofilni antigeni i odgovorni su za veći broj unakrsnih - cross reakcija u serološkim testovima. Poznavanje antigene srodnosti bakterija je neophodno za izvođenje visoko specifičnih seroloških testova i preciznu dijagnozu određenih infektivnih oboljenja životinja .

Ključne reči: imunološke reakcije, antigeni, cross reaktivnost, Gram negativne bakterije, Brucella spp., Yersinia enterocolitica O:9.

Uvod

Klasičan način izolacije i identifikacije bakterija praćen je i određenim nedostacima kao što su nemogućnost izolacije mikroorganizama na veštačkim hranljivim podlogama ili spori rast kolonija. Značajan problem u laboratoriji predstavlja mogućnost infekcije ljudi tokom rada sa izolovanim sojevima uzročnika zooantroponoza ili ispitujućim materijalom koji potencijalno sadrži ove mikroorganizme.

Kao dopunske ili alternativne metode klasičnoj izolaciji i determinaciji infektivnih agenasa koriste se i različiti serološki testovi. Primenom seroloških metoda na indirektan način se otkrivaju infektivna oboljenja životinja, a njihova

* Mr. Krnjaić Dejan asist., Dr. Ašanin Ružica red.prof., Plavšić Budimir dipl. vet. Predmet mikrobiologija i imunologija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

primena smanjuje rizik po zdravlje laboratorijskih radnika. U ispitujućim uzorcima krvnih seruma određuje se prisustvo specifičnih antitela protiv antigena određenih uzročnika. Specifičnost reakcije *in vivo* i *in vitro* zavisi od determinantnih grupa (epitopa) na molekulima antigena i odgovarajućih aktivnih mesta na molekulima antitela. Determinantne grupe se nalaze na određenim mestima antigena i predstavljaju ograničene male delove ovih makromolekula. Kako je njihova struktura genetski regulisana determinantne grupe određuju imunološku specifičnost svakog antigena.

Bakterijske ćelije se sastoje od mnogobrojnih antigena koji za svaku pojedinačnu vrstu određuju imunološku specifičnost. Spoljašnji antigeni koji se nalaze na flagelama i omotačima bakterija su veoma važni u specifičnim reakcijama sa antitelima *in vivo* i *in vitro*. Zbog prisustva hemijski identičnih ili sličnih struktura polisaharidne ili polipeptidne prirode u omotačima bakterija i flagelama postoje srodni antigeni između više vrsta bakterija. Ovi srodni antigeni kod različitih vrsta nazivaju se heterofilni antigeni i odgovorni su za veći broj unakrsnih - cross reakcija u serološkim testovima. Poznavanje antigene srodnosti bakterija je neophodno za izvođenje visoko specifičnih seroloških testova i preciznu dijagnozu određenih infektivnih oboljenja životinja.

Kod bakterija razlikujemo tri glavne vrste spoljašnjih antigena O somatične, H flagelarne i K kapsularne antigene. H antigeni su proteinske prirode, tipski su specifični i prisutni na flagelama a poseduju ih samo pokretne bakterije. O somatični i K kapsularni antigeni su vezani za omotače bakterijske ćelije.

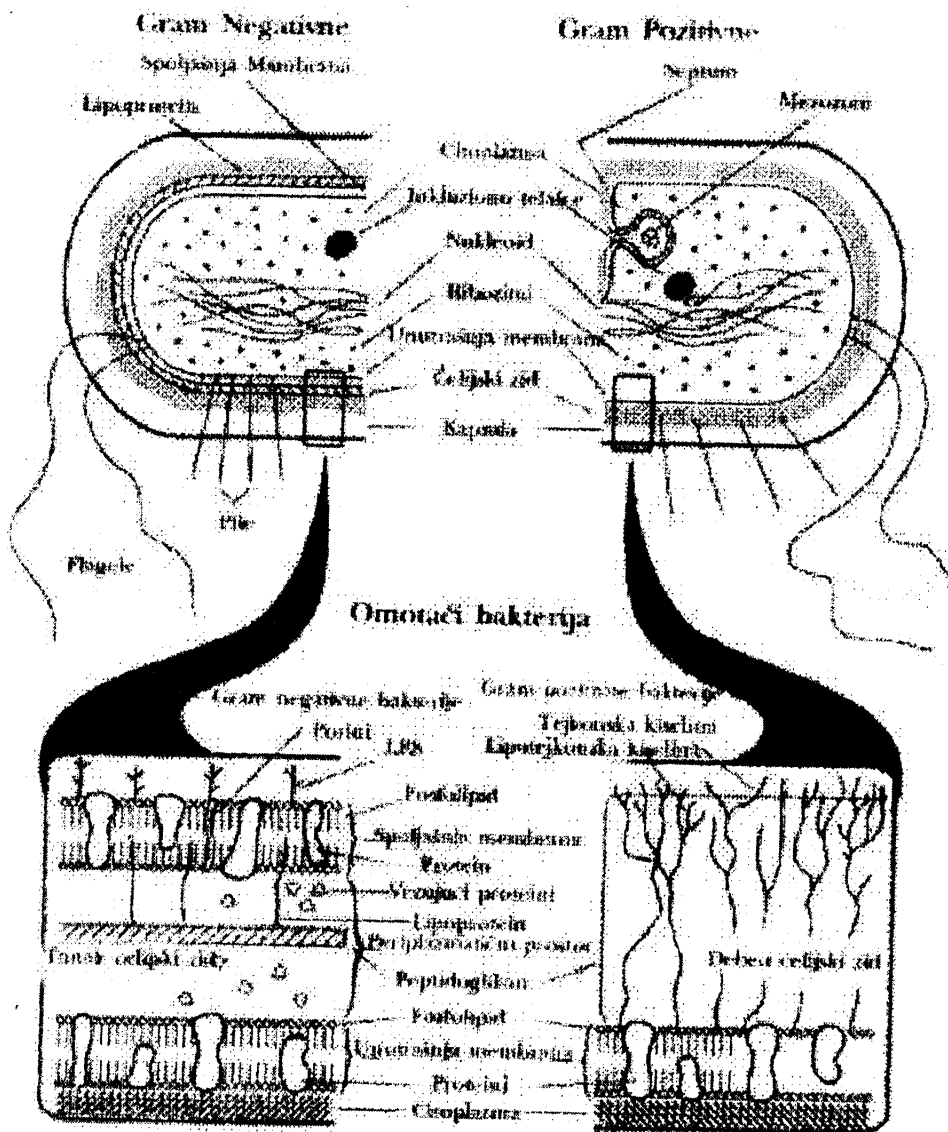
Troslojni omotač bakterija koji okružuje protoplazmu ćelije sačinjavaju plazma membrana, ćelijski zid i kapsula ili sluzavi omotač. Građa omotača bakterijske ćelije je veoma složena a značajne razlike zavise od strukture ćelijskog zida.

Struktura ćelijskog zida se razlikuje kod Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Glavnu komponentu ćelijskog zida čini peptidoglikan (murein) hemijsko jedinjenje isključivo prisutno kod bakterija. Peptidoglikan sačinjavaju paralelni lanci polimerne građe od acetilizovanih disaharida koji su međusobno povezani kratkim peptidnim lancima. Kod Gram pozitivnih bakterija ćelijski zid predstavlja relativno debelu i gustu strukturu širine od 15 do 80 nm sastavljenu od peptidoglikana. Ćelijski zid Gram negativnih bakterija je složene višeslojne strukture i debljine samo 10 nm. Sastoji se od tankog sloja peptidoglikana koji se nalazi između plazma membrane i spoljašnje membrane.

Razlike u strukturi omotača Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija su prikazane na slici broj 1.

Kod Gram negativnih bakterija prisutan je samo jedan sloj peptidoglikana koga kod *Escherichia coli* sačinjavaju naizmenični molekuli N-acetil glukozamina (GINAc) i N-acetil muraminske kiseline (MurNAc) povezani β 1-4 glukozidnim vezama. Treći ugljenikov atom N-acetil muraminske kiseline zamenjen je sa laktil etar grupom koja je vezana za peptidni bočni lanac. Ovi tetrapeptidi sastoje se od L-alanina (L-ala), D-glutamata (D-glu), diaminopimelinske kiseline (DAP) i D-alanina (D-ala) i povezuju kraće polimere acetilizovanih saharida.

Sl. 1 - Struktura omotača Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija

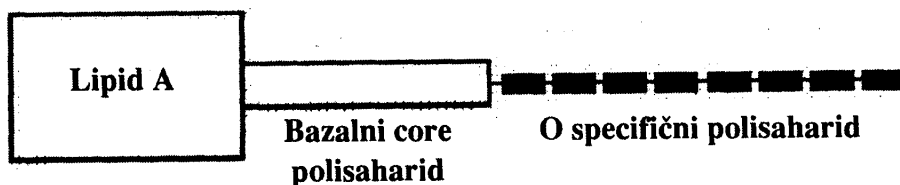


Peptidoglikan je okružen spoljašnjom membranom koju grade dva sloja lipida i u koje su ugrađeni proteini spoljašnje membrane (outer membrane proteins-OMP). Unutrašnja strana spoljašnje membrane sastoji se od fosfolipida sličnih fosfogliceridima plazma membrane. Spoljašnja strana spoljašnje membrane iako sadrži malu količinu fosfolipida građena je uglavnom od lipopolisaharida (LPS).

LPS molekul sastoji se od hidrofobne lipidne komponente (Lipid A) za koji je pričvršćen hidrofilni linearni polisaharidni deo koga sačinjavaju bazalni poli-

saharid (core polisaharid) i O specifični polisaharid. Građa LPS je prikazana na slici broj 2.

Sl. 2 - Građa lipopolisaharida gram negativnih bakterija



Proteini koji se nalaze u spoljašnjoj membrani su specifični za pojedine vrste bakterija a kod E.coli to su Braun-ov lipoprotein, omp A protein, kao i trimerni proteini-porini omp C i OmpF.

Imunološke tehnike se zasnivaju na visoko specifičnim reakcijama antigena i antitela. Antitela reaguju samo sa antigenom koji je indukovao njihovu sintezu. Međutim antitela mogu da reaguju sa hemijski i konformaciono srodnim antigenima drugih mikroorganizama što dovodi do pojave cross reakcija i doprinosi smanjenju specifičnosti seroloških testova.

Primena seroloških metoda u cilju dijagnostike bruceloze kod domaćih životinja i ljudi adekvatan je primer za otežan laboratorijski rad usled antigene srodnosti i cross reaktivnosti Gram negativnih bakterija i pojave nespecifičnih reakcija. Pošto je antigena građa *Brucella* spp bila predmet velikog broja istraživanja dobro je upoznata. LPS predstavlja antigen koji indukuje najbolji humoralni odgovor odnosno sintezu specifičnih antitela. U S fazi *Brucella* LPS se sastoji od lipida A, masnih kiselina, bazalnog polisaharida koji sadrži glukozu, manozu i kvinovosamin i O lanca koji predstavlja homopolimer od oko 100 rezidua 4-formamid-4,6- dideoksimanoze. Rezidue u O polisaharidu su međusobno povezane α 1,2 glukozidnim vezama u A epitopima a kod M epitopa na svakih pet monomernih jedinica prisutna je α 1,3 glukozidna veza (Perry MB i Bundle DR, 1990).

Unutar roda *Brucella* primenom klasičnih testova aglutinacije nije moguće razlikovati pojedinačno vrste. Korišćenjem adsorpcionih reakcija sa purifikovanim antigenima moguća je serološka identifikacija *Brucella* zbog različite zastupljenosti O polisaharidnih A i M epitopa (Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 1995). Pojava R formi dodatno otežava imunodijagnostiku bruceloze. Razlika LPS kod R forme *Brucella* od S forme je u osnovnoj strukturi O polisaharidnog lanca koji je skraćén ili u potpunosti nedostaje. Zbog toga antigenu specifičnost R-LPS određuje bazalni core polisaharid.

Prisustvo 4 amino-4,6 dideoksimanoze u LPS doprinosi antigenu cross reaktivnost *Brucella* spp. sa *Escherichia hermanni* i *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1 i *Yersinia enterocolitica* O:9.

Pojava unakrsnih seroloških reakcija ustanovljena je kod domaćih životinja posle parenteralne inokulacije *Brucella* spp., *E.coli* O:116 i O:157, *Salmonella* grupe N, *Pseudomonas maltophilia* (*Strenotrophomonas maltophilia*) i *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel i sar., 1984). Jedino je *Yersinia enterocolitica* O:9 pored parenteralne i kod peroralne inokulacije indukovala produkciju unakrsno reaktivnih antitela prema *Brucella* spp.. Stvaranje antitela koja unakrsno reaguju prema *Brucella* spp. je posebno zapaženo kod goveda i svinja.

Serološka cross reaktivnost između *Brucella* spp. i *Y. enterocolitica* O:9 direktno je posledica prisustva N-acetilovanog 4-amino-4,6-dideoksi-alfa-D--manopiranozila u O-antigenima *Yersinia* (Caroff M. i sar., 1984a, 1984b).

Pošto su lipopolisaharidni epitopi *Brucella abortus* (A epitop) i *Yersinia enterocolitica* O:9 identične strukture neophodna je primena novih dijagnostičkih metoda koje se zasnivaju na drugim epitopima *Brucella* (M i C epitopima) a koji nisu prisutni kod *Yersinia enterocolitica* O:9 (Kittelberger R i sar., 1998).

U cilju pronalazjenja serološke metode koja se odlikuje većom specifičnošću primenjena su monoklonska antitela protiv M antigena *Brucella melitensis* 16M (Vizcaino N i sar, 1991). Monoklonska antitela su korišćena u kompetitivnom imunoenzimskom testu (ELISA metoda) uz primenu hemijski definisanih lipopolisaharida, O polisaharida i prirodnih haptena *B.melitensis* 16M, *B.abortus* 544 i *Y.enterocolitica* O:9. Primenom monoklonskih antitela uočene su signifikantne razlike u reaktivnosti sa A i M antigenima *Brucella* spp. i sa O polisaharidom *Y. enterocolitica* O:9. Ovi rezultati su u korelaciji sa simultanom ekspresijom A i M epitopa lipopolisaharida S formi kod različitih vrsta *Brucella*. Upotreba monoklonskih antitela prema lipopolisaharidnom M antigenu umesto poliklonskog anti-seruma može biti od velikog praktičnog značaja u cilju smanjivanja rizika pojave seroloških cross reakcija između *Brucella* spp. i *Y.enterocolitica* O:9.

U cilju poboljšanja serološke dijagnoze bruceloze razvijena je kompetitivna ELISA sa primenom monoklonskog antitela 12G12 protiv LPS *B.melitensis* Rev 1 (Weynants V i sar., 1996). Specifičnost novog testa ispitana je na velikom broju seruma uključujući i serume goveda veštački inficiranih sa *Y. enterocolitica* O:9. Specifičnost ELISA testa bila je veća nego specifičnost reakcije vezivanja komplemента i Rose Bengal testa. Međutim primenom i ovog testa mali je broj eliminisanih lažno pozitivnih seruma i od 101 ispitanog uzorka samo 31 serum je isključen kao lažno pozitivan.

Zbog velike antigene srodnosti LPS *Brucella* spp. sa većim brojem bakterija iz familija *Enterobacteriaceae* i *Vibrionaceae* primena antigena proteinske prirode se nameće kao mogućnost za specifičniju imunodijagnostiku bruceloze domaćih životinja. Veliki broj proteina spoljašnje i unutrašnje membrane, protoplazme, periplazme i ribozoma su determinisani kod *Brucella* spp. Određeni proteini pre svega iz protoplazme i ribozoma pobuđuju imunološki odgovor i primenjeni su u novim dijagnostičkim metodama.

Prisustvo specifičnih antitela protiv *Brucella* spp. u krvnim serumima životinja može se utvrditi imunoblot metodom sa ekstraktom cele bakterijske ćelije. Primenom ove visoko specifične metode molekularne biologije sa većim brojem

proteina *Brucella* spp. dobijeni su bolji rezultati u odnosu na one metode koje se zasnivaju na prečišćenim pojedinačnim antigenima proteinske ili LPS prirode (Goldbaum FA i sar., 1991).

Korišćenjem samo jednog imunološkog in vitro testa bilo konvencionalnog ili savremenog uz primenu monoklonskih antitela ili tehnika molekularne biologije nije moguće postaviti sigurnu dijagnozu bruceloze. Zbog mogućih pojava unakrsnih reakcija među Gram negativnim bakterijama i dobijanja lažno pozitivnih rezultata neophodno je primeniti veći broj različitih imunodijagnostičkih postupaka uz obavezna komparativna ispitivanja prisustva antitela ne samo protiv *Brucella* spp nego i protiv *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* grupe N, *E.coli* O:157 i *Proteus* OX-19.

Literatura

1. Brooks GF, Butel JS, Ornston NL-Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 12th edition, 1995.
2. Caroff M, Bundle DR, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR- Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect Immun* 1984, Vol 46, No 2, p 384-388.
3. Caroff M, Bundle DR, Perry MB- Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur J Biochem* 1984 Vol 139, No 1, p 195-200.
4. Corbel M., Fiona J., Stuart A. i Brewer RA- Observation on serological cross-reaction between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Develop. Biol. Stand.*, 1984, Vol 56, p 341-348
5. Goldbaum FA, Morelli L, Wallach J, Rubbi CP, Fassati CA- Human brucellosis: immunoblotting analysis of three *Brucella abortus* antigenic fractions allows the detection of component of diagnostic importance. *Medicine*, 1991, Vol 151, p 227-232.
6. Kittelberger R, Bundesen PG, Cloeckaert A, Greiser-Wilke I, Letesson JJ- Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. *Vet Microbiol* 1998, Vol 60, No 1, p 45-57.
7. Perry MB, Bundle DR- Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*. *Advances in Brucellosis Research*, 1990.
8. Vizcaino N, Chordi A, Fernandez-Lago L- Characterization of smooth *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies. *Res Microbiol* 1991, Vol 142, No 9, p 971-978.
9. Weynants V, Gilson D, Cloeckaert A, Denoel PA, Tibor A, Thiange P, Limet JN, Letesson JJ- Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996, Vol 3, No 3, p309-314.

UDC: 579.61 : 616-078
Original scientific work

SEROLOGICAL CROSSREACTIVITY BETWEEN RELATED ANTIGENS OF GRAM NEGATIVE BACTERIA

Krnjajić, D., Ašanin Ružica, Plavšić Budimir

Summary

Serologic diagnosis, the demonstration of a seroconversion to an antigen of the infecting organism, has been used as an additional or alternative procedure to culture isolation for diagnosis of infectious diseases. Serological tests indirectly detect infectious diseases in animals. The identification is based on the detection on specific antibodies against antigens of certain causative agents. Reactions in vivo and in vitro of antibodies and antigens are highly specific. The smallest unit of a complex antigen that is capable of binding to an antibody is known as an antigenic determinant or epitope. Bacterial antigens could possess identical or similar epitopes, which are the cause of serological cross-reactivity. Possible cross-reaction between related antigens can limit the serological test's specificity.

Key words: immunological reactions, antigens, cross-reactivity, Gram negative bacteria, *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica*.