

Respon Imun Humoral Vaksin Subunit SLPS dan *Brucella* Strain RB51 pada Mencit (*Mus musculus*)

SaifulAnis
Medik Veteriner, Balai Besar Veteriner Maros

Intisari

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi respon imun humoral *smooth Brucella abortus* lipopolysaccharide (SLPS) sebagai vaksin subunit pada mencit BALB/c. Mencit yang diinjeksi dengan sLPS menghasilkan antibody yang tidak berbeda secara statistik dibandingkan dengan mencit yang divaksinasi dengan vaksin *B. abortus* RB51, immunoglobulin yang dihasilkan didominasi IgG2b diikuti IgG3, IgG2a dan IgG1. Penelitian ini secara keseluruhan, data menunjukkan bahwa vaksin subunit sLPS adalah kandidat vaksin yang cukup baik untuk digunakan dalam penelitian lebih lanjut dalam pengembangan vaksin terhadap brucellosis.

Kata kunci: Brucella abortus, sLPS, vaksin subunit, immunoglobulin.

This study was conducted to evaluate the humoral immune response *Brucella abortus* smooth lipopolysaccharide (SLPS) as a subunit vaccine in BALB / c mice. There is no statistically different in antibody produced between mice vaccinated with SLPS mice vaccinated with *B. abortus* RB51 vaccine, which is produced predominantly IgG2b immunoglobulin followed IgG3, IgG2a and IgG1. This research as a whole, the data indicate that the vaccine subunit vaccine candidates that SLPs are good enough to be used in further research in the development of a vaccine against brucellosis.

Pendahuluan

Brucellosis merupakan salah satu penyakit zoonosis bacterial disebabkan oleh genus *Brucella* yang paling sering menyerang manusia. Bakteri ini merupakan organisme intraseluler fakultatif, Gram negative dan tidak membentuk spora. Berdasarkan variasi antigennya dan hospes utamanya, *Brucella* dapat dikelompokkan ke dalam tujuh spesies yaitu: *Brucella melitensis* (pada domba dan kambing), *B. suis* (babi), *B. abortus* (sapi), *B. ovis* (domba), *B. canis* (anjing), *B. neotomae* (rodensia) dan *B. maris* (mamalia laut) (OIE, 2009; Grillo *et al.*, 2012).

Brucella abortus dapat menginduksi terjadinya abortus secara spontan pada sapi sehingga menimbulkan kerugian ekonomi, oleh karena itu diperlukan upaya pengendalian dan pemberantasan. Pencegahan brucellosis di daerah endemis dilakukan melalui vaksinasi, untuk meminimalisir kerugian ekonomi yang disebabkan oleh abortus, infertilitas, anak yang lemah dan penurunan produksi susu (Avila-Calderón *et al.*, 2013).

LPS merupakan bagian terbesar dari struktur *outer membrane* bakteri Gram negative. LPS merupakan *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) yang paling banyak diteliti dari *Brucella*. LPS bersifat sebagai imuno stimulan sangat berpotensi sebagai kandidat vaksin subunit (Simborio *et al.*, 2014).

Lymphocyte B mengatur respon imun humoral pada *adaptive immunity*, ditandai dengan produksi antigen-spesifik antibodi. Selain efek netralisasi, antibodi bertindak sebagai opsonin yang memfasilitasi fagositosis bakteri oleh APCs, komplemen aktif dan meningkatkan antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) oleh makrofag, neutrophil dan sel NK. Pada keadaan tertentu, sel B mempresentasikan antigen yang dapat mengaktivasi imunisasi seluler (Baldwin dan Goenka, 2006).

Meskipun peranan dari imunisasi humoral terhadap infeksi bakteri intraseluler adalah terbatas dan tidak protektif, opsonisasi yang dimediasi oleh antibodi (oleh immunoglobulin IgM, IgG1, IgG2a dan IgG3) meningkatkan fagositosis bakteri pada tingkat infeksi awal infeksi *Brucella* yang berdampak terhadap kelanjutan infeksi intraseluler *Brucella* (Baldwin dan

Goenka, 2006). Dari sudut pandang klinis, deteksi antibodi terhadap Br-LPS secara umum digunakan untuk diagnosa brucellosis pada hewan ternak dan manusia (Al Dahouk et al., 2003).

Pada akhir-akhir ini, penelitian tentang defisiensi sel B pada mencit memberikan gambaran tentang peran regulasi sel B dalam brucellosis, menggambarkan peran kritis respon Th1 pada resistensi hospes. Selama pada fase awal penyakit, sel B memproduksi IL-10 dan transforming growth factor (TGF) β , yang mengatenuasi IFN γ yang dimediasi oleh respon Th1 dan meningkatkan kejadian infeksi persisten (Goenka et al., 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat respon imun humoral yang diperankan oleh immunoglobulin IgM, IgG1, IgG2a dan IgG3 vaksin subunit smooth *Brucella abortus* lipopolysaccharide (SLPS) pada mencit.

Materi dan Metode Penelitian

Materi penelitian

Isolat isolat lapang *B. abortus* diperoleh dari Balai Besar Veteriner Maros, vaksin RB51, vaksin subunit LPS *Brucella* dengan adjuvant Al(OH)₃ (SLPS Al(OH)₃) dan vaksin subunit LPS *Brucella* dengan adjuvant Montanide (SLPS montanide), mencit (*Mus musculus*) BALB/C, PBS steril, Elisa Kit Mouse Ig Isotyping Ready-SET-Go![®] catalog number 88-50630, TMB substrat, 1M phosphoric acid, di ethyl ether, crystal violet 0.05%, hydrogen peroxide 3%, dryslide-oxidase, lead acetate paper, methanol, thionin, thionin blue, safranin O, basic fuchsin, sheep Blood Agar, MacConkey Agar, Nutrient Agar, Urea broth/ slope, Serum Dextros Agar microplate dan slope, Dextrose Agar Base.

Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data.

28 ekor mencit (*Mus musculus*) dikelompokkan dalam empat kelompok dengan tiap kelompok terdiri atas tujuh ekor mencit.

Kelompok I sebagai kontrol diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml NaCl fisiologis steril; kelompok II diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml SLPS Al(OH)₃ (kandungan SLPS 10 μ g); kelompok III diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml SLPS montanide (kandungan SLPS 10 μ g); dan kelompok IV diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml vaksin RB51 mengandung 10⁵ CFU (OIE, 2009).

Serum darah diambil pada hari ke 14 pasca vaksinasi untuk mengetahui tingkat sekresi IgG1, IgG2a, IgG2b dan IgG3. Prosedur anestesi umum dilakukan terlebih dahulu pada mencit sebelum dilakukan pengambilan darah, menggunakan Zoletil[®] dengan dosis 60 mg/kg BB secara intraperitoneal.

Evaluasi respon imun humoral

Evaluasi isotype IgG dalam serum ditentukan menggunakan metode indirect Elisa dengan menggunakan Elisa Kit Mouse Ig Isotyping Ready-SET-Go![®]. Tiap-tiap pengujian dilakukan sesuai dengan protokol manufaktur.

Analisis Data

Data eksperimental yang diperoleh dianalisa menggunakan ANOVA *single factor* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan, kemudian dilanjutkan dengan *Least Significant Different* (OIE, 2009; Grillo et al., 2012; Jain et al., 2014).

Hasil dan Pembahasan

Evaluasi induksi respon imun humoral menggunakan vaksin subunit SLPS *B. abortus* dengan adjuvant Al(OH)₃ (SLPS Al(OH)₃) dan SLPS *B. abortus* dengan adjuvant montanide (SLPS montanide) pada mencit ditentukan berdasarkan nilai optical density (OD) isotype IgG dengan teknik ELISA. Hasil yang didapatkan sesuai dengan yang diharapkan, nilai OD dari

IgG1, IgG2a, IgG2b dan IgG3 pada kelompok mencit yang divaksinasi menggunakan vaksin subunit SLPS *B. abortus* dengan adjuvant Al(OH)₃ dan montanide tidak berbeda nyata dengan

mencit yang divaksinasi menggunakan vaksin RB51, namun berbeda secara nyata dibandingkan dengan mencit pada kelompok control yang diinjeksi menggunakan saline fisiologis ($p < 0.05$) (tabel 1).

Tabel 1. Nilai OD Elisa antibodi Isotype IgG dalam serum *Mus musculus* 14 hari pasca vaksinasi

Kelompok	Vaksin	Nilai OD Elisa Isotype IgG (rata-rata ± SD)			
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
1	NaCl fisiologis	0,18 ^a ± 0,07	0,97 ^a ± 0,14 ^a	3,79 ^a ± 0,04	2,77 ^a ± 0,13
2	SLPS Al(OH) ₃	4,61 ^b ± 1,37	32,19 ^b ± 9,46	75,62 ^b ± 2,45	47,45 ^b ± 6,38
3	SLPS Montanide	5,79 ^b ± 1,71	40,09 ^c ± 8,38	75,87 ^b ± 1,28	49,39 ^b ± 1,56
4	RB51	5,85 ^b ± 1,22	30,90 ^b ± 7,73	75,69 ^b ± 2,49	49,31 ^b ± 2,97

Super skrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

LPS *B. abortus* sangat berbeda dengan LPS kebanyakan bakteri Gram negatif lainnya, LPS *E. Coli* misalnya, selain 10.000 kali lebih lemah tingkat toksisitasnya, LPS *B. abortus* juga 100 kali lebih tidak bersifat *pyrogenic*. LPS *E.coli* tidak memberikan stimulasi respon antibodi spesifik pada mencit strain LPS-*hyporesponsive* C3H/HeJ, sedangkan terhadap mencit strain LPS-*responsive* C3H/HeAu dominan menginduksi produksi antibodi Ig M dan IgG dalam tingkat yang rendah, demikian pula terhadap mencit BALB/c *euthymic* dan *athymic*, hal ini sangat kontras dengan LPS *Brucella* yang memberikan respon antibodi spesifik yang didominasi IgM dan IgG dalam jumlah besar baik pada mencit strain LPS-*hyporesponsive* C3H/HeJ, LPS-*responsive* C3H/HeAu demikian pula terhadap mencit BALB/c *euthymic* dan *athymic* (Kurtz and Berman, 1986; Grilló, 2004).

Hasil evaluasi respon antibody yang ditunjukkan pada penelitian ini adalah kedua jenis vaksin subunit SLPS Al(OH)₃ dan SLPS montanide mampu menghasilkan respon antibodi IgG yang kuat dan setara dengan vaksin RB51, kecuali sekresi IgG2a, dimana SLPS montanide menghasilkan titer yang lebih tinggi. Respon antibodi terhadap SLPS Al(OH)₃, SLPS montanide dan RB51 yang dihasilkan didominasi oleh IgG2. Terdapat dua isotype dari IgG2 yaitu IgG2a dan IgG2b, dimana sekresi keduanya sangat dipengaruhi oleh induksi antigen spesifik (LPS) terhadap sel Th1 yang mengakibatkan aktivasi sel B. Respon imun yang ditandai dengan sekresi IgG2, baik IgG2a atau IgG2b merupakan salah satu bentuk dari respon imun seluler. IgG1 disekresi oleh sel B akibat induksi LPS terhadap sel Th2 sebagai bentuk respon imun humoral (Fernandes *et.al.*, 1996; Golding *et.al* 2001; Schroder 2004; Deenick 2005).

Kesimpulan

Vaksin berbasis SLPS dengan dua adjuvant yang berbeda mampu menginduksi sel B untuk memproduksi titer immunoglobulin IgG1, IgG2a, IgG2b dan IgG3 yang setara dengan sekresi immunoglobulin yang dihasilkan oleh mencit yang divaksinasi menggunakan vaksin RB51.

Ucapan Teerima Kasih

Penelitian ini terlaksanan atas pendanaan dari DIPA tahun 2014 Balai Besar Veteriner Maros, Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. Suwarno, M. Si atas bantuan vaksin dan fasilitas penelitian.

Referensi

- Avila-Calderón, E.D. , A. L. Merino, N. Sriranganathan, S. M. Boyle and A. Contreras-Rodríguez. 2013. Review Article: A History of the Development of Brucella Vaccines. Hindawi Publishing Corporation. BioMed. Res. Inter.
- Deenick, E. K., J. Hasbold and P. D. Hodgkin. 2005. Decision Criteria for Resolving Isotype Switching Conflicts by B cells. Eur. J. Immunol. 35: 2949–2955.
- Fernandes, D.M., X. Jiang, J. H. Jung, C. L. Baldwin. 1996. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. FEMS Immunology and Medical Microbiology 16: 193-203.
- Golding, B., D. E. Scotta, O. Scharf, L. Y. Huang, M. Zaitseva, C. Lapham, N. Ellera and H. Golding. 2001. Immunity and Protection Against *Brucella abortus*. J. Microb. Infect. 3: 43-48
- Grilló, M.J., J.M. Blasco, J.P. Gorvel, I. Moriyón and E. Moreno. 2004. What have we learned from brucellosis in the mouse model?. Veterinary Research.43: 29. <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/29>.
- Jain, S., P. Afley, S.K. Dohre, N. Saxena and S. Kumar. 2014. Evaluation of Immunogenicity and Protective Efficacy of Plasmid DNA Vaccine Encoding Ribosomal Protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/C Mice. J. Vacc. 32:4537-4542. www.elsevier.com/locate/vaccine.
- Kurtz, R.S. and D.T. Berman. 1986. Influence of Endotoxin-Protein in Immunoglobulin G Isotype Responses of Mice to *Brucella abortus* Lipopolysaccharide. J. Infect and Immun. 54(3): 728-734.
- OIE. 2009. Bovine Brucellosis. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health Chapter 2.4.3.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume. 2004. Interferon Gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J. Leuko. Biol. 75.
- Schurig, G.G., N. Sriranganathan and M.J. Corbel. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet. Microbiol. 90: 479-496.
- Simborio, H.L.T., A. W. B. Reyes, H. T. Hop, L. T. Arayan, W. Min, H.J. Lee, H. H. Chang and S. Kim. 2014. Strategies for the development of an effective vaccine against Brucellosis J. Prev. Vet. Med. Vol. 38(2): 53-60. <http://dx.doi.org/10.13041/jpvm.2014.38.2.53>

LPS *Brucella* spp : Struktur, Biosintesis dan Interaksi dengan Sistem Imun Hospes

Saiful Anis

Medik Veteriner, Balai Besar Veteriner Maros

Latar belakang

Brucellosis adalah penyakit infeksius bakterial yang disebabkan oleh bakteri-bakteri dari genus *Brucella*. Brucellosis telah banyak menimbulkan dampak terhadap kesehatan hewan dan manusia, dan secara luas menimbulkan dampak sosial ekonomi, terutama bagi negara-negara yang menandalkan pendapatan utamanya kepada peternakan, baik sebagai penghasil daging maupun susu [1].

Terdapat enam spesies diantara genus *Brucella* yang sampai saat ini sudah diketahui, yaitu: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, dan *B. neotomae*. Klasifikasi ini terutama didasarkan pada perbedaan pathogenisitas dan hospes utamanya [2]. Pathogenik utama diantara bakteri ini adalah *B. abortus* sebagai penyebab brucellosis pada sapi; *B. melitensis* etiologi utama brucellosis pada domba dan kambing, suatu penyakit yang menyebabkan abortus pada domba dan kambing, terutama di negara-negara Mediterania; dan *B. suis* sebagai penyebab brucellosis pada babi. Secara berurutan *B. ovis* dan *B. canis* adalah penyebab epididimitis pada domba dan brucellosis pada anjing [3]. Untuk *B. neotomae* kasus terlapor hanya terjadi pada tikus gurun. Strain *Brucella* juga menyerang satwa liar yang beraneka ragam seperti: bison, rusa, babi liar, serigala, kerbau liar, dan elk [4]. Akhir-akhir ini bahkan muncul dua genus baru *Brucella* pada mamalia laut yaitu *B. pinnipediae* dan *B. cetaceae* [5,6]. Untuk membedakan spesies dan biovar pada saat ini dilakukan dengan pengujian diferensiasi berdasarkan karakteristik phenotip antigen lipopolysaccharida, phage typing, dye sensitivity, kebutuhan CO₂, produksi H₂S dan properti metabolik [7].

Sebagai tambahan, *Brucella* juga berpotensi dijadikan sebagai senjata biologis semenjak diketahui bahwa *Brucella* dapat ditransmisikan melalui spray, sebagaimana telah terlapor adanya pada manusia yang terinfeksi melalui bakterial spraying di laboratorium atau kontaminasi yang terjadi pada saat abortus pada hewan terinfeksi [8]. *Brucella* adalah bakteri yang sangat kontagius, 10 sampai 100 bakteri sudah cukup untuk menimbulkan kontaminasi spray pada manusia.

Makalah ini mereview pentingnya lipopolysaccharida terhadap derajat virulensi *Brucella*, komposisi kimia LPS, genom *Brucella*, gen yang terlibat pada biosintesis LPS dan interaksi antara LPS dan innate immunity.

Komposisi kimia LPS strain *Brucella*

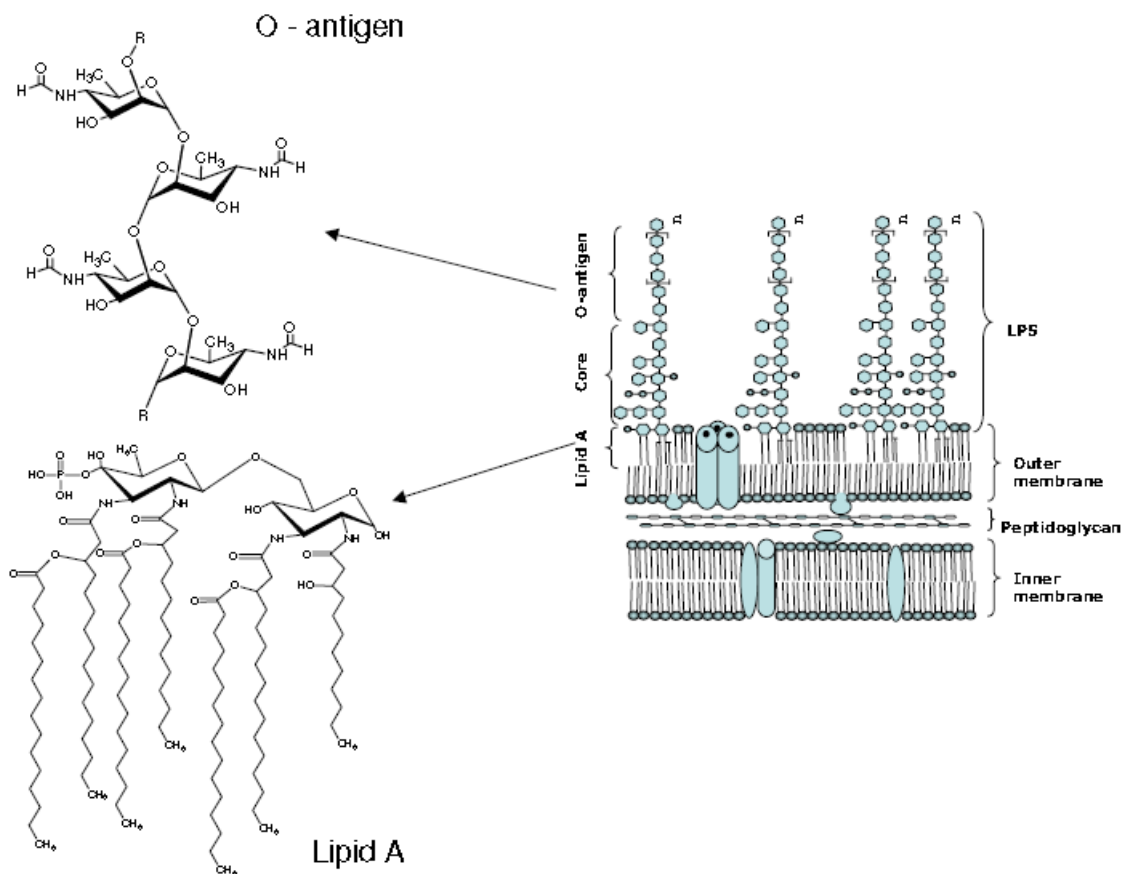
Outer membrane mengandung lipopolysaccharida (LPS) yang merupakan faktor virulensi utama *Brucella*. LPS merupakan komponen yang sangat penting dalam mempertahankan integritas struktur dan fungsional outer membran bakteri Gram negatif. Setiap bakteri Gram negatif selalu mengekspresikan gen penyandi LPS, selain itu LPS juga berperan sebagai target primer dari sistem immune innate mamalia. *Brucella* memiliki struktur LPS non klasik yang unik dibandingkan dengan LPS klasik golongan enterobacteria misalnya *Escherichia coli* [9]. Virulensi utama *Brucella* ditentukan oleh LPS, hal ini dibuktikan dengan berkurangnya kemampuan survival organisme ini ketika secara alamiah kekurangan LPS.

LPS memiliki tiga domain: lipid A, core oligosaccharida, dan O-antigen atau O-side chain (gambar 1.). O-polysaccharida LPS smooth *Brucella* (S-LPS) adalah homopolymer 1,2-linked 4,6-dideoxy-4-formamido- α -D-mannopyranosyl tidak bercabang, biasanya dengan panjang rangkaian rata-rata 96 sampai 100 glycosyl subunits [10]. O-polysaccharida terhubung dengan core oligosaccharida yang tersusun atas manosa, glukosa, 2-amino-2,6-dideoxy-D-glucose (quinovosamine), 2-amino-2-deoxy-D-glucose (glucosamine), 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) dan gula yang tidak teridentifikasi. Lipid A, terhubung dengan core oligosaccharide, mengandung 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose (diaminoglucose) sebagai penyusun utama, amida dan ester-terikat rangkaian panjang jenuh (C16:0 sampai C18:0) dan asam lemak hydroxylated (3-OH-C12:0 to 29-OH-C30:0) [11]. Lipid A hydrophobic pada umumnya menyusun selaput luar outer membrane dan bertanggung jawab terhadap beberapa

properti endotoksik yang berhubungan dengan LPS [12]. *Brucella* lipid A mengandung fragmen protein outer membrane yang memiliki ikatan sangat kuat, prosedur konvensional tidak dapat melepas lipid-A-associated protein dari LPS enterobacteria [11,13].

Heterogenitas LPS enterobacteria diketahui berhubungan dengan panjang O-polysaccharida-nya dan perbedaan kimiawi penyusun core oligosaccharida dan lipid A [14]. Pada enterobacteria lipid A, derajat heterogenitas ini tergantung pada perbedaan kombinasi amida dan asam lemak terikat ester, fosfat, gula netral, ethanolamine dan perbedaan tipe struktur amino gula yang ada pada molekul [15]. Untuk keperluan praktis, perbedaan derajat heterogenitas LPS ini sebagai dasar studi imunologi dan diagnosa brucellosis [16].

Gambar 1. Skematik struktue lipopolysaccharide (LPS) *Brucella* spp.



Genome *Brucella*

Pada saat ini, sequence genome *B. abortus*, *B. melitensis* dan *B. suis* sudah tersedia [17-19]. Genome dari *B. abortus*, *B. melitensis* dan *B. suis* memiliki sequence, organisasi dan struktur yang sangat mirip. Beberapa fragmen memiliki genom yang unik. Komparasi genomik memungkinkan kita untuk membedakan aspek virulensi *Brucella* yang sebelumnya tidak dapat dilakukan. Era teknologi post genomic sekarang ini menawarkan kesempatan untuk memahami secara menyeluruh perbedaan biologis spesies *Brucella*. Pada tingkat proteotome dijumpai perbedaan extensive metabolit antara *B. melitensis* reference strain 16 M dengan strain vaksin Rev1. Sama halnya dengan pada kultur laboratoris *B. melitensi* dan *B. abortus* dapat dibedakan hanya dengan melihat proteotome-nya [20]. Dengan menggunakan sequence komplet *B. melitensis*, Dricot *et al.* [21] menghasilkan database protein-coding ORF dan menyusun perpustakaan ORFome 3091 sebagai jalur untuk membuat klon. Tabel 1 merupakan gen penyandi untuk biosintesis O-antigen pada *Brucella* spp.

Tabel 1. gen penyandi untuk biosintesis O-antigen pada *Brucella* spp.

Gen	Produk
Gmd	GDP-mannose dehidratase
Per	Perosamine synthetase
Pgm	Phosphoglucomutase
Pmm	Phosphomannomutase
ManB	Mannose isomerase
ManC	Mannose guanylyltransferase
Wzm	O-antigen export permease
Wzt	ATP-binding protein
WbkB	no similarity to known genes
WbkC	Methionyl tRNA formyltransferase
WbkA	N-formyl-perosaminyltransferase

Gen yang terlibat pada biosintesis LPS

Pada umumnya penelitian gen dan produknya yang terlibat dalam biosintesis LPS selalu berhubungan dengan sintesis O-chain (tabel 1). Banyak strain mutan atenuasi dengan kelainan pada struktur LPS mengkonfirmasi betapa pentingnya molekul ini terhadap derajat virulensi *Brucella*. Sebaliknya, kepentingan LPS dalam siklus hidup *Brucella*, sangat sedikit yang diketahui tentang metabolic pathway dan enzyme yang dibutuhkan dalam sintesisnya.

Di bawah ini digambarkan beberapa gen utama yang terlibat pada biosintesis LPS dan perannya dalam menyandi produk.

Perosamin synthetase (per)

Godfroid et al. [27] menggambarkan analisis molekuler gen yang dibutuhkan dalam sintesis O-antigen pada *Brucella* melitensis 16 M. Gen perosamine synthetase diklon dan dilakukan sequencing. pada *V. cholerae* O1, perosamine disintesis dari fructose 6-phosphate melalui empat intermediat: mannose 6-phosphate, mannose 1-phosphate, GDP-mannose, dan 4-keto-6-dideoxymannose. Terakhir, produk akhir ini dikonversi menjadi GDP-perosamine oleh perosamine synthetase [23]. Dikarenakan tahap akhir dari perosamine synthesis pathway antara *V. cholerae* dan *B. melitensis* identik maka, diasumsikan tahap-tahap awal identik atau serupa diantara kedua organisme ini. Pada *Brucella*, GDP-perosamine kemudian akan berperan sebagai substrat yang ditambahkan untuk menyusun dan mengalami polimerisasi menjadi O-antigen, ditranslokasikan ke periplasma, ditransfer ke lipid A-core oligosaccharide, dan diekspor ke permukaan sel. Gangguan pada per (B3B2 mutant) menyebabkan ketidakmampuan secara total biosintesis O-sidechain dari *B. melitensis* 16 M.

Phosphomannomutase (pmm atau manB)

Allen et al. [22] dengan lebih baik mengkarakterisasi peran dari O-antigen terhadap virulensi dan kemampuan bertahan menggunakan transposon mutagenesis untuk membuat *B. abortus* rough mutants dengan presentasi defek pada O-antigen. Strain mutan yang ditandai dengan adanya pemotongan rough LPS dan dilakukan analisa sequence DNA terhadap mutan ini, terungkap bahwa gangguan terjadi pada gen penyandi phosphomannomutase (pmm atau manB), yang memiliki aktivitas yang dibutuhkan dalam sintesis full-length core polysaccharide yang akan ditambahkan pada O-antigen. Gen ini bertanggung jawab dalam interkonversi mannose-6-phosphate dan mannose-1-phosphate. Dalam *Brucella*, kedua mannose tersebut adalah prekursor penting dalam O-antigen biosynthetic pathway dan dalam produksi inner core moiety LPS [24].

Phosphoglucomutase (pgm)

Gen penyandi phosphoglucomutase (pgm) adalah gen yang terlibat dalam biosintesis O-antigen pada *B. abortus* [25]. Gen ini secara mutlak dibutuhkan dalam biosintesis ADP-glucose, UDP-glucose, dan UDP-galactose, donor dari glukosa atau galaktosa untuk biosintesis molekul yang mengandung gula ini. *B. abortus* LPS O-antigen adalah homopolymer dari perosamine, suatu derivat dari mannose yang disintesis melalui GDP-mannose, oleh karena itu

spesies pgm mutan tidak dipengaruhi oleh sintesis GDP-perosamine, sebagai pendonor gula dari O-antigen subunit. Insertsi mutagenesis pgm akan menghasilkan *B. abortus* yang memiliki gen resistan terhadap gentamisin dan pada profil elektroperisisnya LPS yang diekstraksi dari mutan

ini kehilangan O-antigen-nya. . Mutan ini tidak dapat bertahan dalam mencit namun dapat bereplikasi pada sel HeLa, hal ini mengindikasikan bahwa LPS komplit tidak esensial dalam invasi atau multiplikasi intraseluler. Perilaku ini menunjukkan bahwa LPS memerankan peran dalam survival ekstraseluler pada hewan, kemungkinan dengan melindungi bakteri terhadap lysis yang dimediasi oleh komplemen, tetapi tidak dengan mekanisme survival intraseluler.

Interaksi antara *Brucella* LPS dan innate immunity hospes

Sangat berbeda dengan pathogen intraseluler lainnya, spesies *Brucella* tidak memproduksi eksotoksin, kapsul antipagosit atau dinding sel yang tebal, bentuk resistensi atau fimbriae, dan tidak menunjukkan adanya variasi antigenik [26]. Kunci dari aspek virulensi *Brucella* terletak pada kemampuannya untuk berproliferasi baik di dalam profesional ataupun non profesional sel pagositik hospes. Oleh karena itu, *Brucella* sukses melewati efek bakterisidal pagosit, dan virulensinya serta infeksi kronis yang dihasilkan didapat melalui kemampuannya menghindari *killing mechanisms* sel hospes [27].

Beberapa penelitian dengan menggunakan non-profesional pagosit menunjukkan *Brucella* menyerang sel hospes dan ditelan ke dalam *early endosome-like vacuoles*. Vakuola ini kemudian dengan cepat menyatu dengan *early autophagosome* yang memperoleh vacuolar H⁺-ATPase dan *lysosome-associated membrane protein* (LAMP) sehingga matang menjadi *late autophagosome*. Autophagosome ini menghambat terjadinya fusi dengan lysosom dan akhirnya menjadi vakuola tempat replikasi secara normal yang berasosiasi dengan retikulum endoplasma [29,31]. Porte *et al.* Menunjukkan bahwa LPS O-side chain terlibat dalam penghambatan fusi awal dari phagosome yang berisi *B. suis* dengan lysosom dalam makrofag bangsa murine pada awal pasca pagositosis [32]. Hal ini sangat kontras dengan phagosome yang berisi rough mutan, yang gagal untuk mengekspresikan O-antigen, yang dengan cepat terjadi fusi dengan lysosom. LPS O-chain bisa jadi sebagai pengatur utama perilaku awal bakteri dalam makrofag.

Pengenalan sel seperti monosit dan makrofak terhadap keberadaan LPS selama berabad-abad menyebabkan respon yang cepat dari hospes mamalia terhadap infeksi Gram negatif. Respon bawaan cepat terhadap LPS ini ditandai dengan keterlibatan pelepasan mediator *pro-inflammatory seperti TNF- α , IL-6, IL-2 dan IL-1 β* yang dalam situs lokal infeksi dalam tingkat sedang menguntungkan hospes dengan menimbulkan peradangan dan dilain pihak sistem kekebalan tubuh akan bekerja untuk menghilangkan organisme penyerang. Namun, dalam kondisi di mana tubuh terpapar LPS berlebihan atau secara sistemik (seperti ketika LPS memasuki aliran darah), maka reaksi inflamasi sistemik dapat terjadi, menyebabkan kegagalan beberapa fungsi organ, shock dan berpotensi menimbulkan kematian [31].

Pengenalan LPS bakteri dimediasi oleh CD14, namun CD14 tidak memiliki transmembran dan intraseluler domain yang diperlukan sebagai sinyal transduksi dengan demikian membutuhkan keterlibatan molekul dari keluarga TLR. Penemuan baru-baru ini tentang protein TLR, mamalia memiliki reseptor pengingat, memberikan wawasan baru dalam memahami mekanisme bagaimana *Brucella* dapat menimbulkan respon seluler dari sel kekebalan bawaan. *B. abortus* menginduksi produksi interleukin (IL) -12 dari monosit manusia dan efek ini diblokir oleh antibodi anti-CD14, menunjukkan bahwa *Brucella* mengikat dan / atau memberi sinyal ke monosit dimediasi oleh LPS [32]. Selain itu, *Brucella* memiliki kemampuan untuk menimbulkan sekresi memperoleh IL-12 yang mendorong sel Th0 untuk berdiferensiasi menjadi sel Th1 effector dan sel memori, dimana hal ini yang merupakan ciri utama dari potensi penggunaan *B. abortus* sebagai vaksin dan pembawa adjuvant.

B. abortus, LPS-nya yang telah dimurnikan dan lipid A memiliki kemampuan untuk memicu TLR2 dan TLR4 dalam aktivasi *innate recognition* dan kemampuan eliminasi bakteri penyerang [33].

Referensi

1. Robinson, A. 2003. *Guidelines for Coordinated Human and Animal Brucellosis Surveillance*. FAO. Rome
2. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ: Genus *Brucella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1*. Edited by: Krieg NR, Holt JG. The Williams & Wilkins, Baltimore; 1984:377-388.
3. Blasco JM: *Brucella ovis*. In *Animal brucellosis* Edited by: Nielsen K, Duncan JR. Boca Raton, FL: CRC Press; 1990:351-78.
4. Davis DS: *Brucellosis in Wildlife*. In *Animal Brucellosis* Edited by: Nielsen K, Duncan JR. CRC Press, Boca Raton, FL; 1990:321-334.
5. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J: Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* 2001, 3:729-738.
6. Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O, Boumedine KS: Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect* 2003, 5:593-602.
7. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM: *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris 1988.
8. Guihot A, Bossi P, Bricaire F: Bioterrorism with brucellosis. *Presse Med* 2004, 33:119-22.
9. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP: *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology* 2005, 8:60-66.
10. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney MAJ, Meikle PJ, Perry MB, Peters T: Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* 1989, 57:2829-2836.
11. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H: *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* 1990, 172:3569-3576.
12. Raetz CRH: Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli and Salmonella Volume 1*. Edited by: Neidhardt FC. Cellular and Molecular Biology; 1996:1035-1063.
13. Rojas N, Freer E, Weintreub A, Ramfrez M, Lind S, Moreno E: Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994, 1:206-213.
14. Freer E, Rojas N, Weintraub A, Lindberg AA, Moreno E: Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol* 1995, 146:569-578.
15. Raetz CR: Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990, 59:129-170.
16. Díaz-Aparicio E, Aragón V, Marín C, Alonso B, Font M, Moreno E, Pérez-Ortiz S, Blasco JM, Diaz R, Moriyón I: Comparative analysis of *Brucella* serotypes A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J Clin Microbiol* 1993, 31:3136-3141.
17. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Sousa M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R: The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:443-448.
18. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM: The *Brucella suis* genome reveals

- fundamentalsimilarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:13148-13153.
19. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC: Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* 2005, 8:2715-2726.
 20. DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mujer CV: The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 2002, 90:587-592.
 21. Dricot A, Rual JF, Lamesch P, Bertin N, et al.: Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome Version 1.1. *Genome Research* 2004, 14:2201-2206.
 22. Allen CA, Adams LG, Ficht TA: Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 1998, 66:1008-1016.
 23. Stroehner UH, Karageorgos LE, Brown MH, Morona R, Manning PA: A putative pathway for perosamine biosynthesis is the first function encoded within the *rfb* region of *Vibrio cholerae* O1. *Gene* 1995, 166:33-42.
 24. Zygmunt MS, Dubray G, Bundle DR, Perry MP: Purified native haptens of *Brucella abortus* B19 and *B. melitensis* 16 M reveal the lipopolysaccharide origin of the antigens. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1988, 139:421-433.
 25. Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde RA: Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect Immun* 2000, 68:5719-5723.
 26. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA: Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (*pgm*) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun* 2003, 71:6264-9.
 27. Godfroid F, Taminau B, Danese I, Denoel P, Tibor A, Weynants V, Cloeckert A, Godfroid J, Letesson JJ: Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16 M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* 1998, 66:5485-5493.
 28. Finlay B, Falkow S: Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, 61:136-169.
 29. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, Moreno E, Gorvel JP: *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998, 66:5711-5724.
 30. Pizarro-Cerda J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP: Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* 1998, 66:2387-2392.
 31. Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulsk-Fox A: Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* 2002, 4:1-10. 52. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP: Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* 2003, 71:1481-1490.
 32. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR: Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* 2002, 4:837-851.
 33. Zaitseva M, Golding H, Manischewitz J, Webb D, Golding B: *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infect Immun* 1996, 64:3109-3119.