148. / 229–242.

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA | 2026. ÁPRILIS

https://doi.org/10.56385/magyallorv.2026.4.229-242

The background of false positive results in *Brucella* serology: fishing with the wrong bait in the wrong pond?

Literature review I.

B. Bányász[1]
J. Antal[2]
B. Dénes[3,4*]

1. Izotóp Intézet Kft., H-1121 Budapest, Konkoly-Thege Miklós út 29-33.

2. VARTID Zrt., Budapest

3. Fertőző Állatbetegségek, Antimikrobiális Rezisztencia, Állatorvosi Közegészségügy és Élelmiszerlánc-biztonság Nemzeti Laboratóriuma, Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

4. Center for Health Disparities and Molecular Medicine, Department of Basic Sciences, Loma Linda University School of Medicine, Mortensen Hall, Loma Linda, CA 92350, USA

denesbela@yahoo.com

A brucellosis vizsgálata során alkalmazott szerológiai eljárások téves pozitív eredményeinek háttere: rossz csalival, rossz tóban horgászunk?

Irodalmi összefoglaló I. rész

Bányász Borbála[1], Antal József[2], Dénes Béla[3,4 *]

JÁRVÁNYTAN

ÖSSZEFOGLALÁS

A szakirodalmi áttekintés első részében a szerzők – szemléletes metaforákat is alkalmazva – részletesen feltárják a brucellózis szerológiai vizsgálataiban előforduló téves pozitív eredmények molekuláris hátterét. Kiemelik a Gram-negatív baktériumok sejtfalának, különösen az S teleptípusú lipopoliszacharidoknak a meghatározó szerepét, és bemutatják a specificitási problémák kialakulásának fő okait.

SUMMARY

Brucellosis is a globally important zoonotic disease caused by *Brucella* spp. Despite intensive control programs, serological testing – essential for monitoring – still lacks ideal specificity. Most tests target smooth lipopolysaccharide (S-LPS), specifically the O-polysaccharide (OPS) component, as the primary antigen. However, OPS structural motifs are conserved across many Gram-negative bacteria, leading to false-positive serologic results (FPSRs) due to cross-reactivity, especially with *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157. The first part of the review delineates the biochemical foundations of FPSRs – using vivid metaphors to illuminate otherwise opaque molecular interactions – with particular emphasis on the structural diversity and immunological behavior of OPS, and the diagnostic implications arising from these features.

A BRUCELLOSIS VIZSGÁLATA SORÁN ALKALMAZOTT SZEROLÓGIAI ELJÁRÁSOK TÉVES POZITÍV EREDMÉNYEINEK HÁTTERE

Az ember és az állatok brucellosisa, valamint a fertőzéssel kapcsolatos egészségügyi és gazdasági következmények évezredek óta ismertek. A brucellosis hátterében álló kórokozókat, a *Brucella* fajokat Bruce írta le először, majd Wright a 19. század végén kidolgozta az első szerológiai diagnosztikai próbát a fertőzés kimutatására [1–3]. Azóta a *Brucella* nemzetség több, mint 30 ismert fajra bővült, beleértve az olyan egzotikus gazdaszervezetekből származó izolátumokat is, mint a cetfélék. A baktérium fiziológiai és genetikai flexibilitását bizonyítja, hogy a kórokozót az emberi mellimplantátumok felületéről is sikerült izolálni [4].

A brucellosis évezredek óta ismert betegség

A brucellák széles gazdaspektrumát, a szervezetben való megtelepedésüket és fennmaradásukat a kórokozó bámulatos alkalmazkodóképessége is biztosítja. A macrophagokban és egyéb phagocyta sejtekben megtelepedett brucellák intracellularisan is képesek szaporodni [5–7]. Ezen túlmenően jól tűrik a szélsőséges környezeti viszonyokat, pl. a hőmérséklet-, pH- és páratartalom-változásokat [8]. A brucellákról alkotott összképet a *Brucella* endotoxin viszonylag enyhe toxicitása teszi érdekessé [9]. Talán nem véletlen, hogy a brucellosis kórjelzésében a szerológiai módszerek terjedtek el, amelyek közül a Wright által kidolgozott csőagglutinációs próba módosított változata még ma is szerepel a diagnosztikai palettán [10].

A brucellák kifejezetten ellenálló baktériumok és képesek a macrophagokban szaporodni

BRUCELLOSIS SZEROLÓGIAI VIZSGÁLATA ROSSZ CSALIVAL ROSSZ TÓBAN HORGÁSZUNK?

A brucellosis immundiagnosztikájában a javasolt próbák kritériumai közül három igény párhuzamos teljesítése jelenti a legnagyobb kihívást mind a kutatók, mind a tesztfejlesztők, valamint az állat-egészségügyi hatóság számára: (i) a *Brucella*-fertőzés korai, (ii) egyértelmű meghatározása, ill. (iii) a tényleges fertőzés és a vakcinázásból eredő szerológiai válasz megkülönböztetése. A szerológusok régóta álmodnak arról, hogy olyan eszközzel rendelkezzenek, amellyel kifoghatják az *aranyhalat* – a tökéletes ellenanyag-antigén komplexum képletes megtestesítőjét –, ezáltal teljesítve az említett három kívánságot. A harmadik "kívánság" nem képezi ennek az összefoglalónak tárgyát, bár a másodikkal azonos vagy annál nagyobb jelentőséggel bír azokban az országokban, ahol a brucellosis elleni vakcinázás a megelőzés részét képezi.

A haszonállat-állományok brucellosisának felderítésére irányuló szerológiai vizsgálatok során jelentkező téves pozitív reakciók és eredmények – különösen a brucellosistól mentes országokban, így Magyarországon is – komoly gazdasági következményekkel járnak (pl. karantén, tej megsemmisítése stb.), amelyek hatásai az élelmiszerlánc minden szegmensét közel egyformán sújtják. Ennek tükrében a hivatalosan engedélyezett szerológiai próbák meghatározása kiemelkedően fontos. Az Állat-egészségügyi Világszervezet – World Organisation for Animal Health (WOAH, korábban OIE) – álláspontja szerint a brucellosis vizsgálata során a pozitív szerológiai reakciók hátterének tisztázásához továbbra is a bár megbízható, ám megfelelő tapasztalat nélkül nehezen végrehajtható és munkaigényes komplementkötési próbát (KK, Complement Fixation Test, CFT) javasolják [10, 11]. A próba további hátránya, hogy nem alkalmazható minden kérődző faj – pl. a lámák –vérsavómintáinak vizsgálatára [12].

A brucellosis szerológiai kimutatása során nagy arányban jelentkeznek téves pozitív reakciók

A szerológiai vizsgálatokat végző laboratóriumok számára évtizedek óta elérhetők az úgynevezett *Brucella*-specifikus enzimhez kötött immunoszorbens (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) próbák, amelyek jelentősen csökkentik a KK-próbák végrehajtása során jelentkező munkaigényt, és lehetővé teszik a vizsgálat automatizálását. Az ELISA-próba azonban szűrővizsgálatokra alkalmas, egyedi vizsgálatokra azonban nem. A pozitív szerológiai eredmények hátterének

A szerológiai vizsgálatokban reagáló ellenanyagok nem kizárólag a **Brucella** *spp. baktériumokkal szemben termelődnek*

tisztázása minden esetben szükséges. Ugyanakkor a szerológiai próbák teljesítőképességét alapvetően befolyásolja a próbák során alkalmazott *Brucella*-antigén minősége. Ugyanis – amint azt az alábbiakban bemutatjuk – a szerológiai vizsgálatokban reagáló ellenanyagok nem kizárólag a *Brucella* spp. baktériumokkal szemben termelődnek [13, 14]. Ennek szemléletes példája a brucellosis vizsgálatára kereskedelmi forgalomban kapható indirekt ELISA (iELISA) próbák bináris osztályozási paramétereinek jellemzői: 95%-os megbízhatóság mellett jó diagnosztikai érzékenység (>98%) és gyenge diagnosztikai specificitás (<60%) [15] – amennyiben figyelembe vesszük a téves pozitív reakciókat (false positive serologic results, FPSR). Sajnálatos módon a gyártók a diagnosztikai teljesítmény ismertetésekor általában nem térnek ki a téves pozitív reakciók előfordulásának gyakoriságára.

A brucellosis szerológia vizsgálatára széles körben alkalmazott ELISA-próbák esetében igen nagy a téves pozitív reakciók kockázata. A probléma mérséklésére számos laboratórium nemcsak a klasszikus KK-próbát, hanem ezzel párhuzamosan a bengálvörös próbát (Rose-Bengal Test, RBT) [16, 17] valamint/vagy a csőagglutinációs próbát (Serum Agglutination Test, SAT) [2, 3, 18, 19] is alkalmazza az ELISA-eredmények felülvizsgálatára [13, 20]. A WOAH által ajánlott próbák diagnosztikai érzékenységét és specificitását a *Táblázat* szemlélteti.

TÁBLÁZAT. *A WOAH által ajánlott diagnosztikai próbák érzékenysége és specificitása (%)*

TABLE. *Diagnostic sensitivity and specificity (%) of tests recommended by WOAH*

Próba [15]	Diagnosztikai érzékenység (%)	Diagnosztikai specificitás (%)
RBT	100 (98,2–100)	86,4 (79,1–91,9)
KK	100 (98,2–100)	94,4 (88,8–97,7)
iELISA	100 (98–100)	58,4 (49,2–67,1)

RBT: Rose-Bengal Test, bengálvörös próba; KK: komplementkötési próba; iELISA: indirekt enzimhez kötött immunoszorbens próba

Az ELISA-próbákban használt **Brucella***-antigén epitópjai keresztreakciót adnak egyes Gram-negatív mikroorganizmusok ellen termelődött ellenanyagokkal*

A téves pozitív reakciók viszonylag gyakori előfordulása mögött több tényező húzódik meg. Ezek közül igen gyakori probléma a határértékek nem egyértelmű meghatározása [21]. Emellett a próbákban használt antigén–ellenanyag kölcsönhatások molekuláris jellemzői is jelentős hatással vannak a reakcióra. A pozitív reakciók megerősítésére szolgáló tesztek eredményeiben is előfordulhatnak téves pozitív reakciók, ahelyett, hogy egyértelműen kizárnák azokat. Ez arra enged következtetni, hogy a megerősítő próbák hajlamosak ugyanolyan téves pozitív eredményeket produkálni, mint az ELISA-próbák. Ennek fő oka feltehetően az, hogy analitikai érzékenységük jóval gyengébb, ami olykor azt a benyomást keltheti, mintha szelektívebben működnének. A szerológiai eljárások téves pozitív eredményeinek forrása – a próbák működési elvétől függetlenül – mind a szűrővizsgálatok során használt ELISA-próbákban, mind a megerősítő vizsgálatokban jelenleg alkalmazott *Brucella*-antigén, amelynek epitópjai keresztreakciót adnak egyes Gram-negatív mikroorganizmusok ellen termelődött ellenanyagokkal. Valószínűsíthető, hogy jóval több keresztreagáló Gram-negatív baktériumfaj vagy más – jelenleg ismeretlen – mikroorganizmus, ill. molekuláris antigén járulhat hozzá a téves pozitivitás kialakulásához, mint amennyit általában a téves pozitivitás kiváltó okának tartunk [20].

A széles körben alkalmazott, ugyanazon *Brucella*-antigén, amely téves pozitív eredményekhez vezet, valamint a téves pozitivitást okozó egyéb, azonosítatlan antigénhatású tényezők valószínű jelenléte fokozza azt a frusztráló helyzetet, hogy amikor a brucellosis elleni immunválasz kimutatásához szükséges, három

különböző követelményt egyszerre kielégítő *Brucella*-specifikus immunglobulinokat próbáljuk megtalálni, olyan, mintha egy mesebeli aranyhalat akarnánk rossz csalival kifogni – esetleg egy olyan tóban, ahol nem is él ilyen hal, vagy ahol mohóbb halak fogyasztják el a csalit, esetleg a zavaros víz miatt a csali el sem jut a megfelelő célpontig.

ROSSZ CSALI

Megfelelő csalival még a legzavarosabb vízben is jó fogást lehet elérni, a megfelelő tóban még az egyébként tökéletlen csali is hasznosnak bizonyulhat. Ahhoz, hogy olyan csalit találjunk, ami a kívánt halakat vonzza, ismernünk kell zsákmányunk ízlését és szokásait – vagyis azt, hogy a *Brucella* baktériumok milyen antigénjellemzői vonzzák a *Brucella*-specifikus ellenanyagokat.

A Brucella *sejtfalantigénjeivel kapcsolatos kérdések*

A *Brucella* spp. tagjaira, mint Gram-negatív baktériumokra, szendvicsszerkezetű sejtfal jellemző, amely a lipopoliszachariddal (LPS) borított bakteriális külső membránból, valamint a belső, citoplazmatikus sejtmembránból áll. A két membrán közötti, úgynevezett periplazmatikus térben egy vékony peptidoglikánréteg található.

Egyes mutáns* Brucella *fajokban hiányzik a vastag, külső LPS réteg

A *Brucella* nemzettség szinte minden tagja ugyanazt a szerkezeti sémát követi. Más Gram-negatív baktériumokhoz hasonlóan [22] azonban komoly biológiai, biokémiai és későbbi szerológiai következményekkel jár az olyan mutáns *Brucella* fajok megjelenése, amelyekből hiányzik a vastag, külső lipopoliszacharid réteg [23]. Ezeket a mutánsokat – a szilárd táptalajon tenyésztett baktériumtelepek vizuális jellemzése alapján – R (rough, durva) típusú brucellaként azonosították. Az R típusú törzsek érdes, szemcsés megjelenésűek, míg az S (sima, smooth) típusú törzsek sima, fényes kolóniákat képeznek. Az R típusú mutánsok virulenciája az itt nem részletezett mutációk következtében radikálisan csökken [23], így potenciálisan vakcinaként alkalmazhatók a bucellosis elleni védekezésben. Mivel ritkán fordulnak elő, a brucellosis szerológiai vizsgálata szempontjából általában csekély a jelentőségük. Vakcinatörzsként való alkalmazásuk ugyanakkor nehézséget jelenthet a vakcinázott és a természetes úton fertőzött állatállomány szerológiai megkülönböztetése tekintetében.

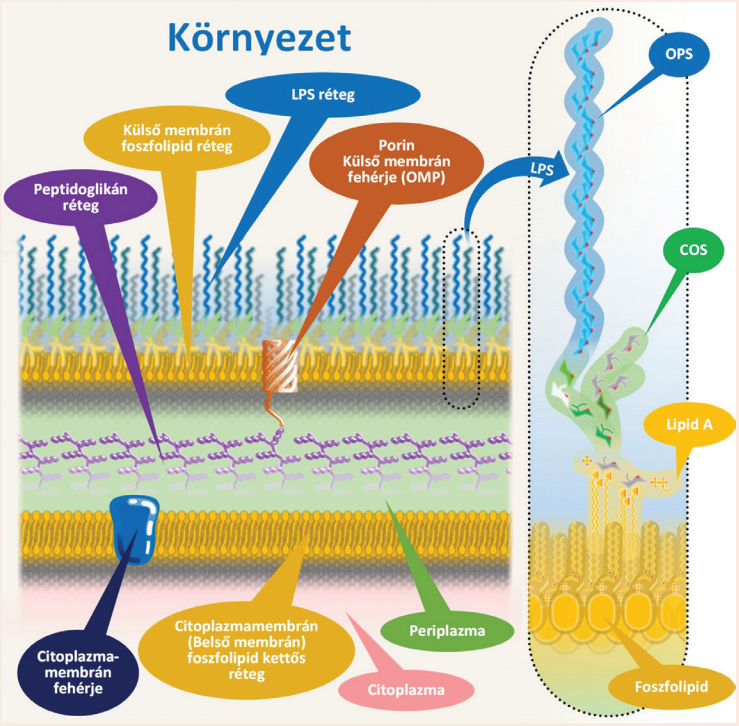
Az S típusú *Brucella* fajok előfordulása lényegesen gyakoribb, így a brucellosis szerológiai vizsgálata során elsősorban ezek felelősek a pozitív eredményekért. Emiatt a következő fejezetekben az S teleptípusú *Brucella* spp. biokémiai és antigén jellemzőit tárgyaljuk.

A sejtfal szerkezetét a baktérium belső részeitől (citoplazma) az extracellularis tér felé haladva ismertetjük *(1. ábra)*. Nem térünk ki részletesen a citoplazmatikus fehérjék működésére, valamint a keletkezésükhöz hozzájáruló biológiai struktúrákra, funkciókra és sejtmechanizmusokra, hanem csupán antigénjellemzőiket vesszük át [24–26].

A citoplazmát a citoplazmamembrán veszi körül, amely foszfolipid kettős rétegként (bilayer) épül fel, és közvetlenül fedi a citoplazmatikus teret, emiatt ezt a réteget citoplazmamembránnak is nevezzük. A citoplazmamembránban különféle membránfehérjék helyezkednek el, de itt is csupán csak antigénmegjelenítő jellemzőiket tárgyaljuk [25]. A citoplazmamembrán külső oldalán található a periplazma, egy strukturált, gélszerű tér, amelynek peptidoglikán membránja szerkezetileg és funkcionálisan is jelentősen eltér a Gram-pozitív baktériumok peptidoglikánjától, mivel nem többrétegű, így sokkal vékonyabb és törékenyebb. A periplazmatikus folyadékban oldott fehérjék (pl. hidrolázok, antibiotikumot lebontó enzimek, hordozófehérjék stb.) és bakteriális toxin alegységek találhatók. Ahogy a citoplazmatikus és membránfehérjék esetében, itt is csupán az áttekintés szempontjából lényeges antigénjellemzőiket részletezzük [27].

1. ÁBRA. *A Gram-negatív baktériumok sejtfalának szerkezete*

FIGURE 1. *Cell wall structure of Gram-negative bacteria*



A sejtfal legkülső részét a külső membrán alkotja, amely egyetlen foszfolipid membrán-rétegből (monolayer) és az ahhoz kapcsolódó lipopoliszacharid (LPS) rétegből épül fel, így aszimmetrikus szerkezetű. Ha az LPS pl. mutációk hatására vékonyabbá válik, az aszimmetrikus felépítés következtében a baktérium felszínének hidrofobicitása jelentősen megnövekedhet, ami fokozza a spontán összecsapódásra való hajlamot – ahogyan azt az R teleptípust előidéző mutációk esetében is megfigyelhetjük. A külső membránt a periplazmatikus peptidoglikánréteget rögzítő specifikus fehérjék, az úgynevezett külső membránfehérjék (OMP-k, outer membrane protein) tartják a helyén. Ezek közül egyes OMP-k a porin család tagjai, amelyek jellegzetes β-hordó (β-barrel) szerkezetükkel, vagyis antiparallel β-redőkből álló csőszerű fehérjestruktúrájukkal biztosítják a sejtfalon keresztüli molekuláris kommunikációt [28–30]. Bár az OMP-k és a brucellosis szerodiagnosztikájában rejlő lehetséges alkalmazásuk részletes ismertetésére a későbbi fejezetekben kerül sor, már itt érdemes megjegyezni, hogy saját vizsgálataink szerint a peptidoglikán-fragmensekkel kovalensen kötött OMP-k intenzív immunválaszt váltanak ki, amelynek a diagnosztikán túlmutató jelentősége lehet [31]. A legújabb vizsgálatok megerősítették, hogy az LPS szerkezete inhomogén, mivel egyaránt tartalmaz teljes hosszúságú poliszacharidláncokat (S-LPS) és csonka formákat (R-LPS), amelyek az OMP-k köré csoportosulnak [22, 32].

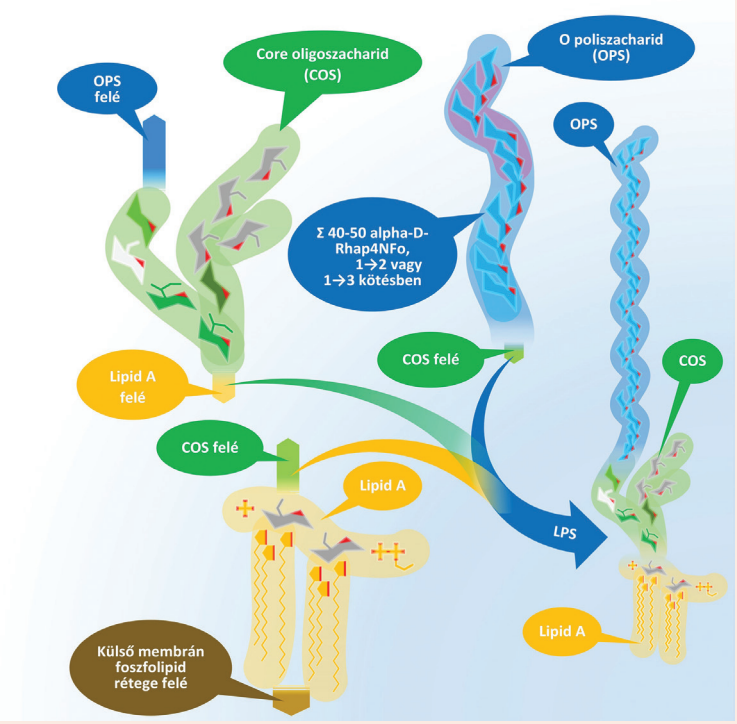
Az LPS hosszú, több tucat monoszacharidból felépülő poliszacharidláncai egy vastag réteget alkotnak

Az LPS hosszú, több tucat monoszacharidból felépülő poliszacharidláncai egy vastag réteget alkotnak, amely a komondor szőrtincseinek jellegzetes struktúráját idézi. Ez a réteg megnehezíti a hidrofób molekulák számára a külső membránon való áthatolást és a periplazmába jutást. A fertőzés korai szakaszában ez az erőteljes „bunda” megtéveszti a gazdaszervezet immunrendszerét, majd később megvédi a *Brucella* baktériumokat a macrophagok általi bekebelezéstől, amelyre az alábbiakban részletesebben utalunk.

Az LPS három, kovalensen összekapcsolt fő elemből áll, amelyek összetételükben, szerkezetükben és működésükben is eltérnek egymástól. Ezek az elemek – a baktériumsejt belsejétől az extracellularis tér felé haladva – a következők: (i) a lipid A, (ii) a mag-oligoszacharid (core oligosaccharide – COS) és (iii) az O-specifikus oldallánc (O-specific oligosaccharide – OPS). A 2. ábra csupán a fő

2. ÁBRA. *A Gram-negatív baktériumok LPS-ének fizikai felépítése a Brucella LPS szerkezeti elemeinek bemutatásával*
LPS: lipopoliszacharid;
OPS: O-specifikus poliszacharid;
COS: core oligoszacharid;
OM: külső membrán

FIGURE 2. *Physical assembly of LPS of Gram-negative bacteria demonstrated by the elements of Brucella LPS*
LPS: lipopolysaccharide;
OPS: O-specific polysaccharide;
COS: core oligosaccharide;
OM: outer membrane

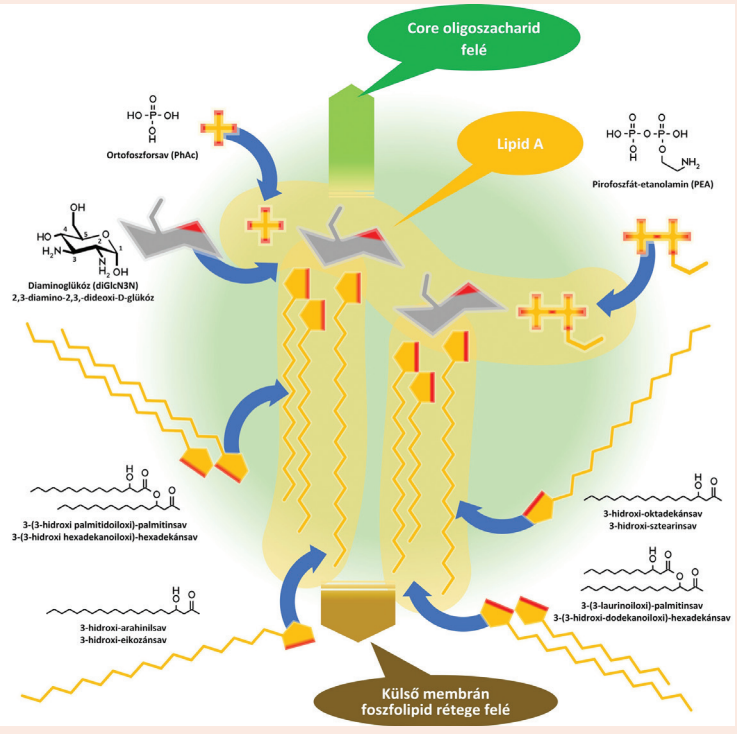


komponensek összeállítását szemlélteti; nem tartalmazva a részletes biokémiai és biofizikai folyamatokat (pl. enzimreakciók, biokémiai útvonalak, sejten belüli szállítási útvonalak és ezek elemei [33]), amelyek a végső összetételt és szerkezetet eredményezik.

A Gram-negatív baktériumok esetében a *3. ábrán* bemutatott lipid A jellegzetesen konzervatív szerkezetű. A lipid A – hasonlóan a foszfolipidekhez – egy hidrofób alapból és az ahhoz kapcsolódó poláros fejből áll, amely lehetővé teszi a külső membrán aszimmetrikus kettősrétegének kialakulását. Általában egy

3. ÁBRA. *A Gram-negatív baktériumok lipid A-jának felépítése a Brucella lipid A szerkezeti jellemzői alapján*
COS: core oligoszacharid;
OM: külső membrán

FIGURE 3. *Assembly of lipid A of Gram-negative bacteria demonstrated by the composition of Brucella lipid A*
COS: core oligosaccharide;
OM: outer membrane



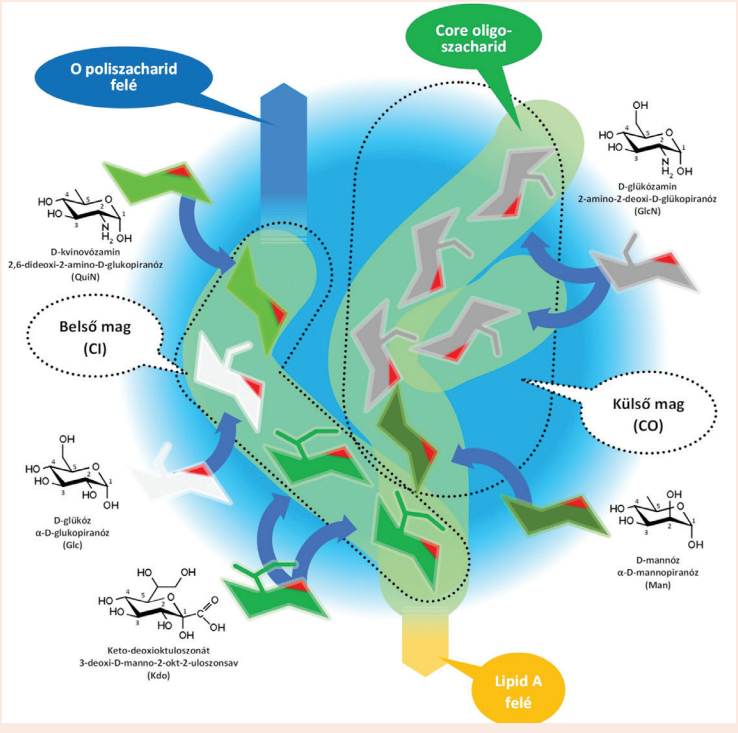
meglehetősen konzervatív szerkezetű, biszfoszforilált diszacharid (hidrofil fej) alkotja, amelyhez különböző hosszúságú és elágazású zsírsavláncok (hidrofób alap) kapcsolódnak acilezéssel. Ezek a lipidkomponensek nem kovalens módon kötődnek a külső membrán foszfolipid-monorétegének hidrofób oldalához.

Habár a lipid A-struktúrák – amelyek az LPS legmélyebben elhelyezkedő, az OM-ba ágyazott részei – szerológiai szempontból kevésbé lényegesek, antigenicitásuk mint a bakteriális endotoxicitás egyik fő meghatározó tényezője, további elemzést érdemel. Ez különösen igaz a brucellák esetében, amelyek kis endotoxicitása hozzájárul e baktériumok rejtőzködő képességéhez [9, 34, 35].

A Gram-negatív baktériumok körében a brucellák lipid A-ja tartalmazza a leginkább hidrofób membránhorgonyt. A *Brucella abortus* lipid A-jában a zsírsavláncok jellemző hossza 16–18 szénatom, bár előfordulnak nagyon hosszú, 28–30 szénatomos egységek is [36, 37, 38], szemben az enterobaktériumokra jellemző C12–C14 láncokkal [34, 39]. A *Brucella* lipid A-molekulájában hat hosszú zsírsavszubsztituens jelentősen megnehezíti az endotoxin felszabadulását, míg a *Yersinia enterocolitica* lipid A-ja – amely csak négy, lényegesen rövidebb zsírsavláncot tartalmaz – jó forrása a szabad endotoxinnak.

Az S típusú brucellák intracellularis életmódját nemcsak a gazdaszervezet immunválaszának mérséklése támogatja az endoplazmatikus retikulumban [6, 7, 35], hanem az LPS lipid A-komponensének stabil membránhoz való rögzítése is hozzájárul ehhez [35]. Ez a tulajdonság gátolja a lizoszómában történő lebomlást, amely az R típusú baktériumok esetében rendszerint bekövetkezik. Bár az LPS ilyen csillapító hatásának pontos mechanizmusa nem teljesen tisztázott, az S-LPS–MHC II-komplexek (fő hisztokompatibilitási komplex – major histocompatibility complex, MHC) létezését alátámasztó adatok arra utalnak, hogy e hatás hátterében a rendkívül hidrofób lipid A további sajátosságai állhatnak [35, 40, 41, 42].

A *4. ábra* a mag-oligoszacharidot (COS) szemlélteti, amely az LPS különböző szerkezetű és funkciójú alegységeit – a lipid A-t, valamint az O-specifikus oldalláncot – kovalens kötéssel összekapcsoló központi struktúraként szolgál. A COS molekuláris diverzitása jelentős nemcsak a baktériumfajok között, hanem az egyes törzsek között is.



4. ÁBRA. *A Gram-negatív baktériumok mag-oligoszacharidjának felépítése a Brucella COS szerkezeti jellemzői alapján*
OPS: O-specifikus poliszacharid

FIGURE 4. *Assembly of core oligosaccharide of Gram-negative bacteria demonstrated by the composition of Brucella COS*
OPS: O-specific polysaccharide

A BRUCELLOSIS VIZSGÁLATA SORÁN ALKALMAZOTT SZEROLÓGIAI ELJÁRÁSOK TÉVES POZITÍV EREDMÉNYEINEK HÁTTERE

A *Brucella* mag-oligoszacharid két szerkezetileg eltérő, elágazó láncokat tartalmazó alegységből áll: a belső magból (inner core, CI) és a külső magból (outer core, CO). Fontos megjegyezni, hogy ezen alegységek efféle osztályozása a legfrissebb kutatási eredmények fényében elavultnak tekinthető. A belső mag (CI) jellemzően ritkán előforduló cukorösszetevőkből épül fel, pl. a karakterisztikus ketodeoxioktonsavból (Kdo) vagy a D-kinovozaminból (QuiN), amelyek a *Brucella* nemzetség sajátosságait tükrözik [43].

A terminális Kdo gyenge savakra érzékeny ketozidos kötés révén kapcsolja a COS-t a lipid A-hoz. A külső magban (CO) a hexózmonomerek száma változó; legfeljebb hat cukoregységből állhat. A monomerek számától függően a külső mag további kisebb elágazásokat is tartalmazhat – pl. *Brucella* esetében a D-glükózamin oldalláncán keresztül. A COS az O-specifikus oldallánchoz (OPS) a belső mag (CI) – mint a *Y. enterocolitica* O:3 szerotípusa és a *Brucella* spp. esetében – vagy a külső mag (CO) – pl. az *Escherichia coli* és *Salmonella spp.* esetében – terminális régiójából kiinduló elágazások révén kapcsolódik [34, 43–47].

Az úgynevezett mély érdesdurva mutánsok – amelyeknél az LPS szerkezetében súlyos, mutációs eltérések figyelhetők meg – (pl. az *E. coli* D31m4 esetében [48]) – vizsgálatának eredménye arra utal, hogy az életképes Gram-negatív baktériumok COS-ának minimális hossza legalább két heptózegység, és rendszerint általában egy Kdo-monomer kapcsolódása szükséges a lipid A-hoz [48]. Léteznek ritka kivételek is, pl. a *Helicobacter pylori* esetében, amelynél a lipid A-hoz mindössze egyetlen Kdo kapcsolódik.

A mag-oligoszacharid változatos összetétele és elágazó szerkezete kiváló alapot kínálhat a baktériumok antigenicitás szerinti azonosításhoz

A COS változatos összetétele és elágazó szerkezete kiváló alapot kínálhat a baktériumok antigenicitás szerinti azonosításhoz. Az S típusú baktériumok esetében azonban ezt a változatosságot szerológiai alkalmazásokban nehéz kihasználni, mivel a COS általában az OPS-réteg alatt rejtve marad. Az OPS-láncok hosszának, amelynek diverzitásáról később tárgyalunk, valamint a különböző OPS-molekulák inhomogén sejtfelszíni elhelyezkedésének (vagyis az R LPS molekulák OMP-k köré csoportosulásának [22, 32]) sokfélesége növeli az intakt sejteken megjelenő COS-motívumok elleni immunválasz kialakulásának elméleti lehetőségét, továbbá az ebben az immunreakcióban részt vevő ellenanyagok szerológiai kimutatásának esélyét.

Az LPS legkülső részét, az O-specifikus oldalláncot (OPS) – amelyet az *5. és 6. ábra* részletez – O-specifikus poliszacharidnak vagy O-antigénnek is nevezik.

Az OPS nagyszámú ismétlődő alegységből áll, amelyek 2–7 különböző összetételű cukorkomponensből épülnek fel. Ismétlődésük jelentős nagyfokú antigénvariabilitást eredményez. Az alegységmintázat jellemző a baktériumfajokra, így alapul szolgálhat a Gram-negatív baktériumok szerológiai csoportosításához.

Az O-specifikus oldalláncban lévő cukoralegységek száma – amely az R mutánsokban drámaian lecsökken – meghatározza a baktériumtelep morfológiáját. Ennek alapján az S teleptípusokat hosszú OPS-láncokkal, míg az R mutánsokat ezek hiányával különböztethetjük meg. Az kis polimerizációs fok miatt a rövid OPS-t tartalmazó LPS-t lipooligoszacharidnak (LOS) nevezik.

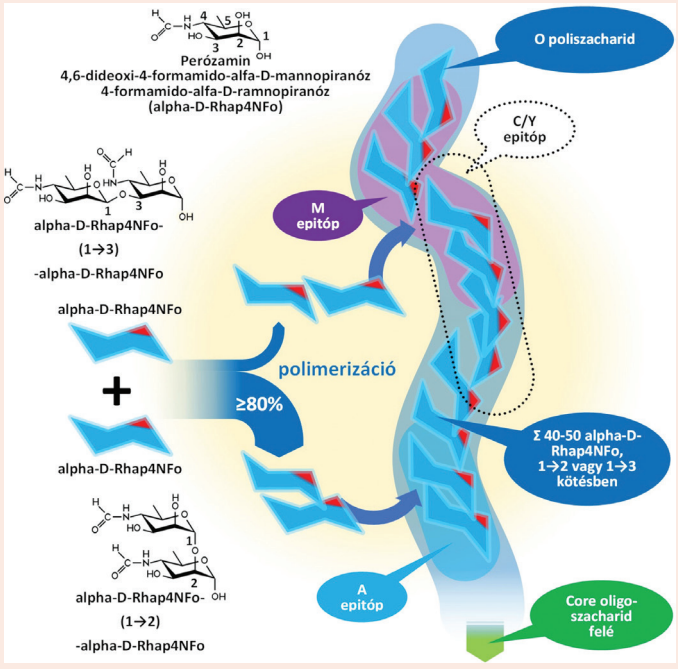
Az O-specifikus oldallánc, amely a sejtfal külső rétegét alkotja, az LPS antigenicitásának fő meghatározója

Az O-specifikus oldallánc, amely a sejtfal külső rétegét alkotja, az LPS antigenicitásának fő meghatározója. Bár szilárd alapot biztosít a Gram-negatív baktériumfajok és -törzsek szerológiai megkülönböztetéséhez, megbízhatósága viszonylag korlátozott [49]. Az OPS molekuláris és topológiai diverzitása elméletileg jelentős: több mint öt tucat különböző cukorrészletet azonosítottak, amelyek a polimer alkotórészeként különböző számban, arányban és mintázatban fordulnak elő. Ezek a komponensek lineáris vagy elágazó láncokba épülhetnek, és akár nem cukoreredetű szubsztituensekhez is kapcsolódhatnak [40, 50].

A nagy teljesítményű genotipizálás korszakát megelőzően, 2005-ig több mint 180 különböző *E. coli* O-szerotípust azonosítottak [50], ami jól érzékelteti a fent említett változatosságot. Paradox módon azonban a jelentős molekuláris diverzitás sok esetben kisebb antigéndiverzitással párosul [50]. Pl. az *E. coli* O35 és a

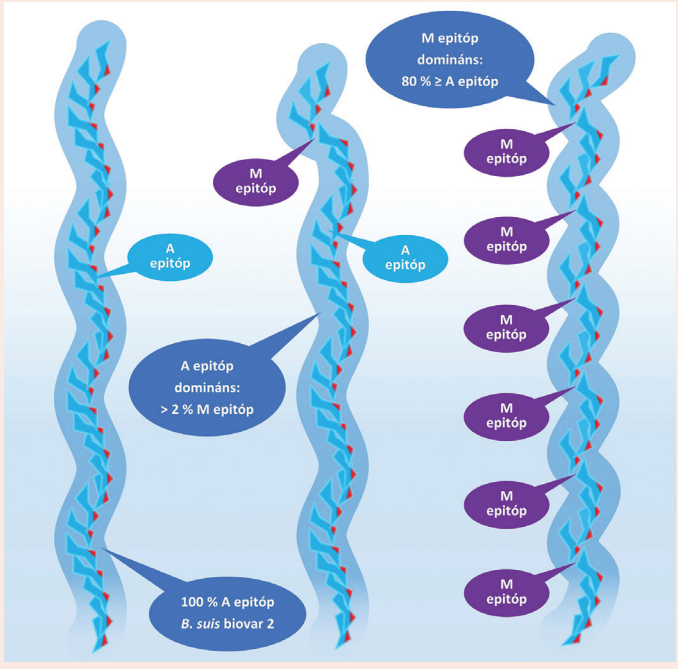
5. ÁBRA. *A Gram-negatív baktériumok O-poliszacharidjának felépítése a Brucella OPS szerkezeti jellemzői alapján*
COS: core oligoszacharid

FIGURE 5. *Assembly of the O-polysaccharide of Gram-negative bacteria demonstrated by the composition of Brucella OPS*
COS: core oligosaccharide



6. ÁBRA. *A különböző antigénjellegű* Brucella *fajok O-poliszacharidjának összetétele*

FIGURE 6. *Composition of the O-polysaccharide of* Brucella *species with a different antigenic character*



Salmonella enterica O62 vagy az *E. coli* O98 és a *Y. enterocolitica* O:11, 24 vagy az *E. coli* O8 és a *Klebsiella pneumoniae* O5 antigénjei azonosak vagy közel azonosak. Hasonlóképpen, a *Brucella* spp. antigénjei jelentős hasonlóságot mutatnak az *E. coli* O157:H7 és a *Y. enterocolitica* O:9 antigénjeivel, ami téves pozitív szerológiai eredményekhez vezethet.

A *Y. enterocolitica* O:9 és a brucellák O-specifikus oldallánca (lásd az *5. ábrát*) jellemzően 4,6-dideoxi-4-formamido-alfa-D-mannopiranóz (alfa-D-Rhap4NFo) cukorrészek homopolimere, amelyek különböző arányban α(1→2) és/vagy α(1→3) kötéseken/szénatomon keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Amint a *6. ábrán* látható, az α(1→2) és α(1→3) kötések előfordulási gyakorisága a *Brucella* spp. törzseiben eltérő, miközben az α(1→3) kötések átlagos aránya 0 és 20% között változik. Az OPS első szacharidmonomere mindig redukáló végű, és α(1→2) kötéssel kapcsolódik a következő cukorhoz.

A Gram-negatív baktériumtörzsek szerológiai megkülönböztetését alapvetően az OPS-ben található ismétlődő oligomer szacharidmotívumok határozzák meg, nem pedig az egyes cukorrészek antitest felismerése. Az OPS terminális része kivételes jelentőségű szerológiai szempontból [51].

A brucellák szerológiai felosztása a baktériumfajokat célzó korai tipizálási kísérletek közé tartozik. Az első vizsgálatokat Wilson 1932-ben végezte el [52], megelőzve a *Salmonella* spp. (1935) és az *E. coli* (1944) későbbi szerotipizálását, amelyeket Kaufman úttörő munkája alapozott meg [53–56]. Az elsőként leírt szerotípusok – az „M" a *Brucella melitensis,* ill. az „A" a *Brucella abortus* esetében – alapozták meg a később kialakult *Brucella* M és A antigéncsoportosítást alapját, amely a jelenleg rendelkezésre álló ismeretekhez vezetett; ezt az *5. és 6. ábra* is összegzi [51, 57, 58].

A *Brucella* OPS az A, M, C/Y és C antigéneket hordozhatja. A jelenlegi ismeretek szerint [57] az A antigén egy alfa-D-Rhap4NFo egységet képvisel, amely két alfa-D- Rhap4NFo szacharid között α(1→2) kötéssel kapcsolódik. Egyszerűbben fogalmazva: az A antigén két alfa-D-Rhap4NFo egységből áll, amelyeket α(1→2) kötés kapcsol össze (lásd az *5. ábrát*). Az M antigén négy alfa-D-Rhap4NFo egységből álló klasztert alkot, amelyben központi kapcsolatot egy α(1→3) kötés képezi, míg a klaszter végpontjainál lévő két szacharidot α(1→2) kötés kapcsolja össze. Más szóval, az M antigén két A antigén egységből épül fel, amelyeket egy α(1→3) kötés kapcsol össze. Amint a *6. ábrán* látható, a *Brucella* nemzetségben ismert legalább egy olyan baktériumfaj, amely egységes antigénprofilt mutat: a *B. suis* biovar 2 kizárólag A antigéneket tartalmaz [59]. Ritka kivételektől eltekintve a *Brucella* OPS terminális régiója közelében általában α(1→3) kötés található [51].

A molekuláris alapú antigénmeghatározás pontosabb tipizálást tesz lehetővé

A molekuláris alapú antigénmeghatározás pontosabb tipizálást tesz lehetővé. Az A/M arányok alapján pl. a *B. suis* 2-es biovariánsa teljesen A-domináns (100%-ban A antigént tartalmaz), míg a *B. melitensis* 16M törzse mindössze 21%-ban tartalmaz M antigént [60].

A C/Y és a C antigének létezése továbbra is vitatott. Elméletileg úgy jellemezhetők mint átfedő A és M antigének különböző arányokkal. A C/Y antigén – pl. a *Brucella* nemzetség egyes tagjainak és a *Y. enterocolitica* O:9 törzs közös antigénje – több A-t tartalmaz, mint M-et, míg a C antigén esetében az A és M arány közel azonos (A = M) [61]. Ha fenntartjuk a *hal és csali* metaforát, akkor ezek *a csalétkek a legnagyobb szájú halak számára készültek* – ebből következően kisebb szelektivitást eredményeznek.

Szerológiai szempontból az S típusú Gram-negatív baktériumok védő LPS-rétegének legkülső poliszacharid komponense meglehetősen egységesnek tűnik, mivel az itt előforduló cukoregységek választéka a baktériumcsaládok között is rendkívül korlátozott. Következésképpen az izolált, S-LPS eredetű antigének szerológiai vizsgálatokban történő alkalmazása szinte automatikusan téves pozitív eredményhez vezet. Az alkalmazott *csalétek* nyilvánvalóan távol áll a tökéletestől.

A ROSSZ TÓ

Miközben a korábbi elemzés feltárta a jelenleg használt csalikkal kapcsolatos problémákat, ill. felvázolt néhány olyan – később részletesen kifejtendő – lehetőséget a jobb eredmények elérése érdekében, úgy a tavat benépesítő halak jellemzői és a tó tisztasága további alapos vizsgálatot igényelnek.

ZAVAROS VIZEK

A gazdapopulációban jelen lévő immunreaktív ellenanyagok valamelyike kölcsönhatásba léphet a próbáinkban szereplő antigénnel – azaz a *Brucella* S-LPS-szel –, és téves pozitivitást okozhat, ami a brucellosis gyanúját keltheti, valamint az állat-egészségügyi hatóság intézkedését teszi szükségessé. A tó túlságosan zavaros ahhoz, hogy a valódi zsákmányt azonosítani lehessen, ha jelen van egyáltalán.

A fejlett szerológiai vizsgálati módszerek megjelenése óta számos Gram-negatív baktérium esetében figyeltek meg keresztreakciót

A fejlett szerológiai vizsgálati módszerek megjelenése óta jól dokumentáltak a keresztreakciók számos Gram-negatív baktérium esetében, mint pl. a *Yersinia enterocolitica* O:9, az *Escherichia coli* O157, a *Salmonella urbana* O30, az *Escherichia hermannii*, a *Francisella tularensis*, a *Stenotrophomonas maltophilia* 555, a *Salmonella godesberg* és a *Vibrio cholerae*. Ezek a keresztreakciók a mai napig aggodalomra adnak okot [15, 20, 57, 62–64]. Az említett, valamint más – még nem azonosított – enyhe vagy tünetmentes betegséget okozó, nem patogén baktériumtörzsek előfordulása bizonyos és gyakorlatilag elkerülhetetlen az állatállományokban.

Fontos figyelembe venni, hogy az emlősök fejlett immunrendszerének „vakbuzgalma" a zavarosság egyik forrása. Ez abból fakad, hogy az immunrendszer vakon reagál, és ellenanyagokat termel szinte bármilyen idegen ágens ellen, legyen az bakteriális vagy nem bakteriális eredetű. Amennyiben szerológiai vizsgálatainkban továbbra is S-LPS-antigéneket kívánunk alkalmazni, elengedhetetlen, hogy a vizsgálati eredmények értelmezésekor az oligo- vagy poliszacharidantigének minden lehetséges forrását figyelembe vegyük. Ez a feladat önmagában is rendkívül nehéz, ha nem lehetetlen. A téves pozitivitást okozó, nem bakteriális eredetű antigénekkel kapcsolatos problémát még figyelembe sem vettük.

Minden antigénhatású komponens – beleértve a nem bakteriális eredetű antigéneket is – növeli a szérumban jelen lévő keresztreagáló ellenanyagok koncentrációját azáltal, hogy olyan immunválaszt indukál, amely során az S-LPS-szel vagy annak komponenseivel kölcsönhatásba lépő antitestek képződnek. Ennek következtében alacsony jel-zajarány alakul ki, ami megnehezíti vagy akár ellehetetleníti a valódi *Brucella*-ellenes antitestek kimutatását. A specifikus diagnosztikai próba szempontjából kívánatos ellenanyag-antigén reakció így kompetitív gátlás alá kerül. Más szóval: a tó zavarossága önmagában temérdek álaranyhalat hoz létre, amelyek mohón harapnak, így az igazi zsákmánynak alig van esélye elérni a tökéletlen csalit.

RIVALIZÁLÓ HALRAJOK – AZ IMMUNVÁLASZ IDŐBELI LEFOLYÁSA

A tó zavarossága nem az egyetlen akadálya az aranyhalak kifogásának. Az aranyhalaknak léteznek alpopulációik, és nem minden aranyhal képes mindhárom kívánságot teljesíteni. Ezen túlmenően erőfeszítéseinket az is hátráltathatja, hogy az immunválasz kinetikájától függően különböző ellenanyag-osztályok fordulnak elő.

A brucellák által alkalmazott lopakodó mechanizmusok célja a gazdaszervezet immunrendszerének modulálása, amelynek fő célkitűzései a következők: (i) a fertőzés helyén a gyulladás megelőzése, (ii) a fagocitózis elkerülése, (iii) a gazdasejtek apoptózisának gátlása, valamint (iv) a citokinválasz blokkolása. Bár a legfrissebb vonatkozó ismeretek mélysége lényegesen túlmutat e dolgozat keretein, jelen munkánkban elsősorban az ellenanyagválaszra helyezzük a hangsúlyt [6, 7, 35, 39, 65–73].

A *Brucella*-fertőzés esetén az immunválasz kezdetben átmeneti, de erőteljes humoralis reakcióval indul [74, 75]. A sejtes immunválasz később alakul ki, rendszerint a fertőzést követő 3–4 héten belül [76, 77], és intradermalis bőrpróbával akár több évig is kimutatható marad [77]. Akut fázisban az immunválaszt elsősorban az IgM-izotípus képviseli, amely dominánsan jelenik meg [78]. Elhúzódó lefolyás esetén – ill., ha a kezdeti IgM-válasz nem mutatható ki – a betegség kiújulása megnövekedett IgM-szinttel járhat [79]. Az immunválasz ezt követően 2–4 héten belül IgG-izotípusra vált [79].

A különböző típusú szerológiai tesztek célérzékenysége eltér az egyes immunglobulin-izotípusok tekintetében

Az izotípusváltás – vagy annak hiánya – elméletileg felhasználható a téves pozitív és a valódi pozitív eredmények megkülönböztetésére [80]. A fertőzés korai felismeréséhez szükséges követelmények teljesülését azonban jelentősen akadályozza fentebb említett, izotípusváltáshoz kötődő várakozási idő. Mivel a különböző típusú szerológiai tesztek célérzékenysége eltér az egyes immunglobulin-izotípusok tekintetében, a szerológiai eredmények pontos értelmezéséhez elengedhetetlen további információ a fertőzés időbeli lefolyásáról az egyes gazdaszervezet esetében. Ez az információ azonban gyakran hiányzik, és bár esetleg pótolható, előfordulhat, hogy nem áll rendelkezésre.

Dolgozatunk következő részében áttekintjük mindazokat a kutatási és fejlesztési törekvéseket, amelyek a specificitási problémák kezelésére irányultak, különös tekintettel az ELISA-alapú módszerekre. Megvizsgáljuk, miként hasznosíthatók e vizsgálatok eredményei a szeropozitív minták hitelesítésére szolgáló próbák tervezésében. Elemzésünket olyan összefoglaló keretbe helyezzük, amely eltér a hagyományos tudományos közlemények hangvételétől: egy halászati metafora segítségével érzékeltetjük a téves pozitív reakciók összetett, gyakran rejtve maradó jelenségkörét, és rávilágítunk azokra a módszertani megoldásokra, amelyek a diagnosztikai megbízhatóság „tisztább vizei” felé vezethetnek.

IRODALOM

1. Herron JBT, Dunbar JAT (2018) The British Army's contribution to tropical medicine. Clinical Medicine (London, England) 18:380–383. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-5-380

2. Wright A, Smith F (1897) On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever: And on the further application of the method of serum diagnosis to the elucidation of certain problems in connexion with the duration of immunity and the geographical distribution of disease. Lancet (London, England) 1:656–659

3. Wright AE, Semple D (1897) On the employment of dead bacteria in the serum diagnosis of typhoid and Malta fever, and on an easy method of extemporising a blowpipe flame for making capillary sero-sedimentation tubes. Brit Med J 1:1214–1215. https://doi.org/10.1136/bmj.1.1898.1214

4. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse H J, De BK (2010) *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol 60:801–808. https://doi.org/10.1099/ijs.0.011148-0

5. Celli J (2019) The intracellular life cycle of *Brucella* spp. Microbiol Spectr 7:10.1128/microbiolspec.BAI-0006-2019. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0006-2019

6. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP (2011) An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. Immunol Rev 240:211–234. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x

7. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E (2007) *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. PloS One 2:e631. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000631

8. Brucellosis in sheep and goats-European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. SANCO.C.2/AH/R23/2001. Available online: https://ec.europa.eu/food/system/files/2020-12/sci-com_scah_out59_en.pdf (accessed on 12 July 2001)

9. Leong D, Diaz R, Milner K, Rudbach J, Wilson JB (1970) Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. Infect Immun 1:174-182. https://doi.org/10.1128/iai.1.2.174-182.1970

10. World Organisation for Animal Health (WOAH) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2022) Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) Chapter 3.1.4.B.2. Available online: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf. (accessed on May 2022)

11. Wise. B, Craig HW (1942) The *Brucella* complement fixation reaction. J Infect Dis 70:147–151

12. Gilsdorf MJ, Thoen CO, Temple RM, Gidlewski T, Ewalt D, Martin B, Henneger SB (2001) Experimental exposure of llamas (*Lama glama*) to *Brucella abortus*, humoral antibody response. Vet Microbiol 81:85–91. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00346-7

13. Ducrotoy MJ, Muñoz PM, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I (2018) A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. Prev Vet Med 151:57–72. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.005

14. Ducrotoy MJ, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I (2016) A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. Vet Immunol Immunopathol 171:81–102. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002

15. Muñoz PM, Marín CM, Monreal D, González D, Garin-Bastuji B, Díaz R, Mainar-Jaime RC, Moriyón I, Blasco JM (2005) Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. Clin Diagn Lab Immunol 2:141–151. https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.141-151.2005

16. El-Tantawy LA, Farahat LF, Ramadan ES, Warda FF (2020) Effects of chemically pretreated bovine serum samples on sensitivity of Rose Bengal test for serodiagnosis of bovine brucellosis. J Appl Vet Sci 5:6–12. https://doi.org/10.21608/javs.2020.8 5550

17. Corbel MJ (1973) Studies on the mechanism of the Rose Bengal plate test for bovine brucellosis. Br Vet J 129:157–166. https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)36540-5

18. Macmillan AP, Cockrem DS (1985) Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. Res Vet Sci 38:288–291.

19. McMahon KJ (1983) Comparison of the 2-mercaptoethanol and dithiothreitol tests for determining *Brucella* immunoglobulin G agglutinating antibody in bovine serum. Can J Comp Med 47:370–372

20. Bonfini B, Chiarenza G, Paci V, Sacchini F, Salini R, Vesco G, Villari S, Zilli K, Tittarelli M (2018) Cross-reactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 vs *Brucella* spp. Vet Ital 54:107–114. https://doi.org/10.12834/VetIt.1176.6539.2

21. Almuneef MA, Memish ZA, Balkhy HH (2004) Importance of screening household members of acute brucellosis cases in endemic areas. Epidemiol Infect 132:533–540. https://doi.org/10.1017/s0950268803001857

22. Gammoudi I, Mathelie-Guinlet M, Morote F, Beven L, Moynet D, Grauby-Heywang C, Cohen-Bouhacina T (2016) Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. Colloids Surf B: Biointerfaces 141:355–364. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.006

23. Huber M, Kalis C, Keck S, Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Beutler B, Galanos C, Freudenberg MA (2006) R-form LPS, the master key to the activation ofTLR4/MD-2-positive cells. Eur J Immunol 36:701–711. https://doi.org/10.1002/eji.200535593

24. Han X, Tong Y, Tian M, Sun X, Wang S, Ding C, Yu S (2014) Characterization of the immunogenicity and pathogenicity of malate dehydrogenase in *Brucella abortus*. World J Microbiol Biotechnol 30:2063–2070. https://doi.org/10.1007/s11274-014-1631-2

25. Faria AR, Dorneles E, Pires S, Andrade HM, Lage AP (2020) Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals potential of recombinant antigens for discriminating vaccinated from naturally infected cattle. Microb Pathog 147:104–345. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104345

26. Hop HT, Arayan LT, Simborio HL, Reyes AW, Min W, Lee HJ, Lee JJ, Chang HH, Kim S (2016) An evaluation of ELISA using recombinant *Brucella abortus* bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 45:16–19. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.006

27. Nagalingam M, Basheer TJ, Balamurugan V, Shome R, Kumari SS, Reddy G, Shome BR, Rahman H, Roy P, Kingston JJ, Gandham RK (2021) Comparative evaluation of the immunodominant proteins of *Brucella abortus* for the diagnosis of cattle brucellosis. Vet World 14:803–812. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.803-812

28. Bulashev A, Akibekov O, Syzdykova A, Suranshiyev Z, Ingirbay B (2020) Use of recombinant *Brucella* outer membrane proteins 19, 25, and 31 for serodiagnosis of bovine brucellosis. Vet World 13:1439–1447. https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1439-1447

29. Vatankhah M, Beheshti N, Mirkalantari S, Khoramabadi N, Aghababa H, Mahdavi M (2019) Recombinant Omp2b antigen-based ELISA is an efficient tool for specific serodiagnosis of animal brucellosis. Braz J Microbiol 50:979–984. https://doi.org/10.1007/s42770-019-00097-z

30. Koyuncu I, Kocyigit A, Ozer A, Selek S, Kirmit A, Karsen H (2018) Diagnostic potential of *Brucella melitensis* Rev1 native Omp28 precursor in human brucellosis. Cent Eur J Immunol 43:81–89. https://doi.org/10.5114/ceji.2018.74877

31. Bányász B, Antal J, Dénes B (2025) Ghostbuster—a Western blot-based panel method to resolve false-positive brucellosis serology test results. Microorganisms 13:574. https://doi.org/10.3390/microorganisms13030574

32. Vassen V, Valotteau C, Feuillie C, Formosa-Dague C, Dufrêne YF, De Bolle X (2019) Localized incorporation of outer membrane components in the pathogen *Brucella abortus*. EMBO J 38:e100323. https://doi.org/10.15252/embj.2018100323

33. Bohl TE, Aihara H (2018) Current progress in the structural and biochemical characterization of proteins involved in the assembly of lipopolysaccharide. Int J Microbiol 5319146. https://doi.org/10.1155/2018/5319146

34. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV (2006) Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. J Endotoxin Res 12:205–223. https://doi.org/10.1179/096805106X118825

35. Ahmed W, Zheng K, Liu ZF (2016) Establishment of chronic infection: *Brucella's* stealth strategy. Front Cell Infect Microbiol 6:30. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00030

36. Ferguson GP, Datta A, Baumgartner J, Roop RM2nd, Carlson R W, Walker GC (2004) Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucell*a BacA affect lipid-A fatty acids. Proc Natl Acad Sci USA 101:5012–5017. https://doi.org/10.1073/pnas.0307137101

37. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J Bacteriol 172:3569–3576. https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990

38. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC (2006) *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microb Cell Fact 5:13. https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13

39. Tsolis RM, Young GM, Solnick JV, Bäumler AJ (2008) From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. Nat Rev Microbiol 6:883–892. https://doi.org/10.1038/nrmicro2012

40. Caroff M, Novikov A (2020) Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identifications. OCL 27:31. https://doi.org/10.1051/ocl/2020025

41. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Curr Opin Microbiol 8:60–66. https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.003

42. Forestier C, Moreno E, Méresse S, Phalipon A, Olive D, Sansonetti P, Gorvel JP (1999) Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. Infect Immun 67:4048–4054. https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.4048-4054.1999

43. Wilkinson SG (1996) Bacterial lipopolysaccharides –– themes and variations. Prog Lipid Res 35:283–343. https://doi.org/10.1016/s0163-7827(96)00004-5

44. Frirdich E, Whitfield C (2005) Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. J Endotoxin Res 11:133–144. https://doi.org/10.1179/096805105X46592

45. Gil-Ramírez Y, Conde-Álvarez R, Palacios-Chaves L, Zúñiga-Ripa A, Grilló MJ, Arce-Gorvel V, Hanniffy S, Moriyón I, Iriarte M (2014) The identification of wadB, a new glycosyltransferase gene, confirms the branched structure and the role in virulence of the lipopolysaccharide core of *Brucella abortus*. Microb Pathog 73:53–59. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.06.002

46. Fontana C, Conde-Álvarez R, Ståhle J, Holst O, Iriarte M, Zhao Y, Arce-Gorvel V, Hanniffy S, Gorvel JP, Moriyón I, Widmalm G (2016) Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence. J Biol Chem 291:7727–7741. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701540

47. Salvador-Bescós M, Gil-Ramírez Y, Zúñiga-Ripa A, Martínez-Gómez E, de Miguel MJ, Muñoz PM, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Moriyón I, Iriarte M, Conde-Álvarez R (2018) A new *Brucella* lipopolysaccharide core glycosyltransferase identified by genomic search and phenotypic characterization. Front Microbiol 9:2293. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02293

48. Qureshi N, Takayama K, Mascagni P, Honovich J, Wong R, Cotter RJ (1988) Complete structural determination of lipopolysaccharide obtained from deep rough mutant of *Escherichia coli*. Purification by high performance liquid chromatography and direct analysis by plasma desorption mass spectrometry. J Biol Chem 263:11971–11976.

49. DebRoy C, Fratamico PM, Yan X, Baranzoni G, Liu Y, Needleman DS, Tebbs R, O'Connell CD Allred A, Swimley M Mwangi M, Kapur V, Garay JA, Roberts EL, Katani R (2016) Comparison of O-antigen gene clusters of all O-serogroups of *Escherichia coli* and proposal for adopting a new nomenclature for O-typing. PloS One 11:e0147434. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147434

50. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G (2006) The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. FEMS Microbiol Rev 30:382–403. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x

51. McGiven J, Howells L, Duncombe L, Stack J, Ganesh NV, Guiard J, Bundle DR (2015) Improved serodiagnosis of bovine brucellosis by novel synthetic oligosaccharide antigens representing the capping m epitope elements of *Brucella* O-polysaccharide. J Clin Microbiol 53:1204–1210. https://doi.org/10.1128/JCM.03185-14

52. Wilson GS, Miles AA (1932) The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group. Br J Exp Pathol 13:1–13

53. Kaufmann F (1944) Zur serologie der *Coli* gruppe. Acta Pathol Microbiol Scand 1:20–45

54. Kauffmann F (1935) Ueber einen neuen serologischen formenwechsel der Typhusbacillen. Z Hyg Infektionskr 116:617–651

55. Kauffmann F (1936) Untersuchungen uber die korperantigene in der *Salmonella*-gruppe. Z Hyg Infektionskr 117:778–791

56. Kauffmann F (1949) On the serology of the *Klebsiella* group. Acta Pathol Microbiol Scand 6:381–406

57. Bundle DR, McGiven J (2017) Brucellosis: Improved diagnostics and vaccine insights from synthetic glycans. Acc Chem Res 50:2958–2967. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00445

58. Kubler-Kielb J, Vinogradov E (2013) Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. Carbohydr Res 378:144–147. https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.03.021

59. Zaccheus MV, Ali T, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Weintraub A, Iriarte M, Moriyón I, Widmalm G (2013) The epitopic and structural characterization of *Brucella suis* biovar 2 O-polysaccharide demonstrates the existence of a new M-negative C-negative smooth *Brucella* serovar. PloS One 8:e53941. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053941

60. Ganesh NV, Sadowska JM, Sarkar S, Howells L, McGiven J, Bundle DR (2014) Molecular recognition of *Brucella* A and M antigens dissected by synthetic oligosaccharide glycoconjugates leads to a disaccharide diagnostic for brucellosis. J Am Chem Soc 136:16260–16269. https://doi.org/10.1021/ja5081184

61. Zygmunt MS, Bundle DR, Ganesh NV, Guiard J, Cloeckaert (2015) A Monoclonal antibody-defined specific C epitope of *Brucella* O-polysaccharide revisited. Clin Vaccine Immunol 22:979–982. https://doi.org/10.1128/CVI.00225-15

62. Dieste-Pérez L, Blasco JM, de Miguel MJ, Moriyón I, Muñoz PM (2015) Diagnostic performance of serological tests for swine brucellosis in the presence of false positive serological reactions. J Microbiol Methods 111:57–63. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.00

63. Chenais E, Bagge E, Lambertz ST, Artursson K (2012) *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. Infect Ecol Epidemiol 2:10.3402/iee.v2i0.19027. https://doi.org/10.3402/iee.v2i0.19027

64. Corbel MJ (1975) The serological relationship between *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica* serotype IX and *Salmonella* serotypes of Kauffmann-White group N. J Hyg (Lond) 75:151–171. https://doi.org/10.1017/s0022172400047173

65. Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, Manček-Keber M, Barquero-Calvo E, Palacios-Chaves L, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E, Martirosyan A, von Bargen K, Grilló MJ, Jerala R, Brandenburg K, Llobet E, Bengoechea JA, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP (2012) The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. PLoS Pathog 8:e1002675. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002675

66. Bienvenu A, Martinez E, Bonazzi M (2021) Undercover agents of infection: the stealth strategies of t4ss-equipped bacterial pathogens. Toxins 13:713. https://doi.org/10.3390/toxins13100713

67. Cornejo E, Schlaermann P, Mukherjee S (2017) How to rewire the host cell: a home improvement guide for intracellular bacteria. J Cell Biol 216:3931–3948. https://doi.org/10.1083/jcb.201701095

68. Zhang K, Wang H, Guo F, Yuan L, Zhang W, Wang Y, Chen C (2016) OMP31 of *Brucella melitensis* 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF-α. Exp Ther Med 12:2783–2789. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3655

69. Ma QL, Liu AC, Ma XJ, Wang YB, Hou YT, Wang ZH (2015) *Brucella* outer membrane protein Omp25 induces microglial cells *in vitro* to secrete inflammatory cytokines and inhibit apoptosis. Int J Clin Exp Med 8:17530–17535.

70. de Jong MF, Rolán HG, Tsolis RM (2010) Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. Cell Microbiol 12:1195–1202. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01498.x

71. von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP (2012) Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. FEMS Microbiol Rev 36:533–562. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x

72. Byndloss MX, Tsolis RM (2016) *Brucella* spp. virulence factors and immunity. Annu Rev Anim Biosci 4:111–127. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111326

73. Jiao H, Zhou Z, Li B, Xiao Y, Li M, Zeng H, Guo X, Gu G (2021) The mechanism of facultative intracellular parasitism of *Brucella*. Int J Mol Sci 22:3673. https://doi.org/10.3390/ijms22073673

74. Oliveira SC, Soeurt N, Splitter G (2002) Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. Vet Microbiol 90:417–424. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00225-0

75. Khatun MM, Islam MA, Baek BK, Lee SI (2009) Cellular and humoral immune responses and antigen recognition in Sprague-Dawley rats experimentally infected with *Brucella abortus* biotype 1. Asian J Anim Vet Adv 4:267–277. https://doi.org/10.3923/ajava.2009.267.277

76. Bercovich Z (2000) The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review. Vet Q 22:123–130. https://doi.org/10.1080/01652176.2000.9695040

77. Saegerman C, Vo TK, De Waele L, Gilson D, Bastin A, Dubray G, Flanagan P, Limet JN, Letesson JJ, Godfroid J (1999) Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. Vet Rec 145:214–218. https://doi.org/10.1136/vr.145.8.214

78. Im YB, Park WB, Jung M, Kim S, Yoo HS (2016) Evaluation of Th1/Th2-related immune response against recombinant proteins of *Brucella abortus* infection in mice. J Microbiol Biotechnol 26:1132–1139. https://doi.org/10.4014/jmb.1512.12046

79. Solís García Del Pozo J, Lorente Ortuño S, Navarro E, Solera J (2014) Detection of IgM antibrucella antibody in the absence of IgGs: a challenge for the clinical interpretation of *Brucella* serology. PLoS Negl Trop Dis 8: e3390. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003390

80. Jindan RA, Saleem N, Shafi A, Amjad SM (2019) Clinical interpretation of detection of IgM anti-*Brucella* antibody in the absence of IgG and vice versa; a diagnostic challenge for clinicians. Pol J Microbiol 68:51–57. https://doi.org/10.21307/pjm-2019-006

Közlésre érk.: 2025. máj. 2.