

ENKELE ASPEKTE VAN BAKTERIOLOGIESE NAVORSING.

1. INLEIDING.

Wanneer die mens die een of ander van die haas onbekende aantal bakteriese besmettings opdoen, is dit noodsaaklik dat die spesifieke siekteverwekkende bakterie so gou moontlik geïdentifiseer sal word ten einde met 'n

belangrike variasies t.o.v. antigeniese samestelling, aan die lig te bring nie. Daarom moet die biochemiese identifikasie opgevolg word deur die meer sensitiewe en noukeuriger serologiese identifikasie waarvoor 'n kennis van die antigeniese samestelling van die betrok-

die simptome wat dit openbaar, moet, in die eerste instansie, die bakterie geïdentifiseer word op grond van sy biochemiese aktiwiteite. Hierdie biochemiese identifikasie is egter nie alleen 'n tydrovende proses nie maar dit gee ook nie altyd akkuraat uitspraak aangaande die identiteit van die bakterie nie en wel omdat dit, enersyds, die identifikasie in sommige gevalle slegs tot by die genus moontlik maak en, andersyds, in elk geval nie sensitief genoeg is om intraspesifieke variasies, veral die

stof wat, as dit, langs 'n ander weg as deur die spysverteringskanaal, in die bloedstroom beland, die mens- of dierliggaam tot die vorming van teenliggame prikkel. Wanneer teenliggamevorming deur 'n antigeniese bestanddeel gestimuleer word dan is die gevormde teenliggame spesifiek vir daardie besondere antigeen m.a.w. dit reageer slegs daarmee en met geen ander nie. Stowwe deur die spysverteringskanaal ingeneem kan wel antigenees wees maar dan slegs as hulle in die bloedstroom opge-

neem word sonder dat hulle vooraf deur die spysverteringsensieme verander is.

Behalwe vir enkele uitsonderinge kan 'n stof as antigeen kwalifiseer slegs indien dit vreemd is aan die liggaam waaraan dit toegedien word. Dit verklaar die onverenigbaarheid van verskillende bloedgroepe tydens bloed-oortappings en die onsuksesvolle weefseloortplanting van een diersoort op 'n ander en selfs van een persoon op 'n ander.

Hoewel die bakteriese sel so geweldig klein is (die breedte van 'n staafvormige bakterie van gemiddelde grootte, soos *Bact. coli*, wissel van 1/2000 tot 1/1000 mm. en die lengte van 2/1000 tot 3/1000 mm.) en, oppervlakkig geoordeel, so eenvoudig in samestelling skyn te wees, verteenwoordig dit 'n ingewikkelde en gespesialiseerde samestelling en organisasie. Binne die geweldige klein selstruktuur is daar altyd 'n komplekse verskeidenheid van antigene teenwoordig waarvan elkeen die mens- of dierliggaam prikkel tot die vorming van teenliggame slegs teen homself en elkeen reageer ook slegs met sy eie spesifieke of homoloë teenliggame. Hierdie reaksie is verskillend by verskillende omstandighede maar is altyd van so 'n aard dat die antigeen deur die teenliggaam onskadelik gemaak word.

Die antigeniese bestanddele teenwoordig in nie-verwante spesies verskil sodanig van mekaar dat die een spesie nooit met die antiserum teen 'n ander sal reageer nie. In die geval van twee naverwante spesies of twee verskillende variëteite binne dieselfde spesie mag

hulle egter een of meer antigene met mekaar in gemeen hê met die gevolg dat hulle wel kruisreaksies met mekaar se antisera sal vertoon. Bakterie No. 1 kan bv. die antigene a, b, c en d besit sodat 'n antiserum wat daarteen berei word die teenliggame A, B, C en D sal bevat. No. 2 besit antigene b, e, f en g en sy homoloë antiserum sal dus teenliggame B, E, F en G bevat. Op grond van die teenwoordigheid van antigeen b in albei organismes, sal No. 1 met antiserum 2 reageer en omgekeerd. Word teenliggaam B egter uit albei antisera verwyder dan sal elkeen slegs met sy homoloë antiserum reageer. Voordat die gevolgtrekking dus gemaak kan word dat die twee bakterieë identies is moet dit bo alle twyfel bewys kan word dat albei dieselfde aantal antigene besit en dat die antigene in albei gevalle dieselfde is.

Die teenliggame is in die bloedstroom aanwesig as gewysigde serumproteïene wat gevorm word in daardie liggaamsweefsels wat met bloedvorming belas is. Dit bestaan uitsluitlik uit gewysigde serum globulien en hiervan hoofsaaklik die gamma-fraksie.

3. ONTLEDING VAN DIE ANTIGENIESE SAMESTELLING VAN 'N BAKTERIE.

Die heel eerste taak is om te demonstreer dat die betrokke bakterie wel antigeniese bestanddele bevat. Daarna is dit die strewe om vas te stel hoeveel antigene daar teenwoordig is, om elkeen te identifiseer en uiteindelik om vas te stel in watter deel van die selstruktuur dit geleë is.

(a) **Demonstrasie van die teenwoordigheid van antigene.**

Die teenwoordigheid van antigene moet deur middel van positiewe antigeen-teenliggaamreaksies bewys word en die eerste stap in hierdie rigting is om 'n bloedserummonster van 'n proefdier te neem en dit teenoor die betrokke bakterie te toets ten einde seker te maak dat die normale serum van die dier geen teenliggame teen dié bakterie bevat nie. Hierna word die proefdier teen die bakterie geïmmuniseer deur onder andere 'n suspensie van die bakterieë in sy bloedstroom in te spuit waardeur hy gedwing word om teenliggame teen die antigene van die bakterie te vorm as lg. sodanige antigene bevat. Die serum wat na immunisasie uit die proefdier verkry word sal dan die homoloë antiserum wees van die bakterie waarmee gewerk word. Om nou uit te vind of die bakterie antigeniese bestanddele bevat moet, deur middel van antigeen-teenliggaamreaksies, bewys word dat die serum van die geïmmuniseerde dier teenliggame bevat.

Die antigeen-teenliggaamreaksie en derhalwe die teenwoordigheid van antigene kan op verskillende maniere gedemonstreer word waarvan veral drie van besondere belang is nl. deur agglutinasie, presipitasie en hemagglutinasie.

Agglutinasie. Wanneer 'n bakteriese suspensie met sy homoloë antiserum gemeng word pak die bakterieë saam in kloppe wat selfs met die blote oog sigbaar is.

Presipitasie. Wanneer 'n antigeen in oplossing is en met sy homoloë antiserum gemeng word, word 'n antigeen-teenliggaamverbinding gevorm wat as

'n neerslag uitsak. Om die antigene in oplossing te kry moet van chemiese ekstraksiemetodes gebruik gemaak word. Die antigene is egter almal baie gevoelige chemiese verbindings en drastiese metodes moet vermy word om te voorkom dat hulle ontaard, verander of beskadig word.

Hemagglutinasie. Dit is moontlik om antigene in oplossing op die oppervlakte van rooibloedselle te adsorbeer en wanneer lg. dan met antiserum gemeng word vind hemagglutinasie of agglutinasie van die rooibloedselle plaas. Hierdie metode verskaf 'n baie sensitiewe toets vir die teenwoordigheid van antigene. Enige hoeveelheid verskillende antigene kan gelyktydig op die oppervlakte van rooibloedselle geadsorbeer word. Die een skyn nie die adsorpsie van die ander te verhinder nie. Dit verskaf verder 'n metode om te onderskei tussen proteïen- en polisaccharied-antigene. Eersgenoemde kan nie op onbehandelde rooibloedselle geadsorbeer word nie; die selle moet eers gesensitiseer word deur voorafgaande behandeling met tanniensuur. Polisaccharied-antigene kan op onbehandelde sowel as tanniensuur-behandelde selle geadsorbeer word.

(b) **Lokalisasie van die antigene.**

Sommige bakterieë besit 'n enkele of 'n groot aantal flagella. Dit is baie dun, lang, haaragtige uitgroeisels van die sitoplasma. Daar word 'n onderskeid gemaak tussen die antigene wat in die flagellum(la) voorkom d.i. die flagellêre of "H" antigene en dié wat in die eintlike sel voorkom d.i. die somatiese of "O" antigene. Die "H" antigene bestaan hoofsaaklik uit pro-

teïenmateriaal en word vernietig deur verhitting tot 56°C of deur behandeling met absolute alkohol. Die "O" antigene daarenteen is termostabiel en bestaan dikwels vir 'n groot gedeelte uit koolhidrate.

Dit is in elke geval noodsaaklik om vas te stel of die antigeniese bestanddele van die bakterie in sy flagellum of in sy selgedeelte gelokaliseer is, m.a.w. of die bakterie net "O" antigene bevat of beide "O" en "H" antigene. Dit kan tot 'n sekere mate gedoen word op grond van die voorkoms van die agglutinaat. In die geval van "O" antigene is dit die bakteriese selle wat aanmekaar pak om 'n stewige agglutinaat te vorm min of meer met die voorkoms van miniatuur haelstene. In die geval van "H" agglutinasie is dit die flagella wat aanmekaar pak om 'n lossere agglutinaat met die voorkoms van flokkies te vorm.

Om egter bo alle twyfel tussen "O" en "H" antigene te kan onderskei is die besit van suiwer "O" en "H" teenliggame noodsaaklik. Op grond van die verskil in bestandheid teen temperatuur tussen "O" en "H" antigene is dit tot 'n groot hoogte moontlik om suiwer "O" teenliggame te berei deur die bakterieë wat vir immunisasie gebruik word met absolute alkohol te behandel en dit vir 'n halfuur tot 56°C te verhit. Daardeur word die "H" antigene vernietig en die antiserum behoort suiwer "O" teenliggame te bevat. Suiwer "H" teenliggame kan egter nie deur immunisasie berei word nie aangesien metodes wat die vernietiging van die "O" antigene ten doel het ook die "H" antigene sal vernietig. Dit moet dus

langs 'n omweg bereik word deur antiserum te berei wat beide tipes teenliggame bevat en die "O" teenliggame dan uit die mengsel te verwyder. Tot dusver is dit gedoen deur die "O" teenliggame uit die mengsel te absorbeer met suiwer "O" antigene. 'n Tweede metode, waarvan die doeltreffendheid nog nie ten volle bewys is nie maar wat groot belofte inhou, is 'n termiese differensiasie tussen die twee tipes teenliggame. Dit berus op die tot dusver eenaardige verskynsel dat wanneer die antiserum in teenwoordigheid van gliserien, om ontaarding van die proteïene te voorkom, tot 70°C verhit word dan word die "O" teenliggame vernietig terwyl die "H" teenliggame nie geaffekteer word nie.

(c) **Bepaling van die aantal antigene.**

Die aantal antigene in 'n mengsel kan met behulp van die volgende metodes vasgestel word. 1. Die metode van Oudin soos gewysig deur Oakley en Fullthorpe en nog later gewysig en aangepas deur Polson. 2. Die metode van Ouchterlony. 3. Immuno-elektroforese. Aldrie hierdie metodes berus op antigeen-teenliggaamreaksies in 'n agargel.

Oudintegniek. Die beginsel waarop dit berus is dat verskillende bestanddele in 'n mengsel verskillende diffusiesnelhede mag hê afhangende, onder andere, van die molekulêre grootte van die komponente. Wanneer die antigeenmengsel toegelaat word om van een punt af in 'n vertikale agarkolom te diffundeer sal dié komponente met groter diffusiesnelhede verder beweeg as dié met kleiner snelhede en na 'n bepaalde tyd sal die verskillende anti-

gene op verskillende posisies in die agarkolom aanwesig wees. Word die homoloë antiserum toegelaat om van die teenoorgestelde punt af in die kolom in te diffundeer, word 'n horisontale lyn van presipitaat gevorm waar elke antigeen sy homoloë teenliggaam ontmoet. Die aantal lyne wat gevorm word is dus 'n aanduiding van die minimum aantal antigene wat in die mengsel aanwesig is. Die eksperiment word opgestel deur 'n kolom agar, gemeng met antiserum, in die bodem van 'n proefbuis van ongeveer 6 x 1 cm, te giet. Daarop volg 'n kolom suiwer agar en heelbo 'n kolom agar, gemeng met die antigeen (fig. 1). Die antigene diffundeer van bo af in die middelste agarkolom in en die teenliggame van onder af. Daar moet natuurlik rekening gehou word met die omstandigheid dat twee of meer van die komponente naastenby dieselfde diffusiesnelhede mag hê. Die ooreenstemmende presipitaatlyne sal dus aanvanklik so na aan mekaar geleë wees dat dit na een lyn mag lyk (fig. 1 B). Na genoegsame tydverloop sal hulle egter uitmekaar beweeg en wat aanvanklik een lyn was sal opbreek in twee of meer lyne (fig. 1 C en D). As een of meer komponente suiwer uit die mengsel gehaal kan word is dit moontlik om vas te stel watter lyn of lyne in die spektrum daaraan te wyte is. Deur 'n besondere komponent se homoloë teenliggaam uit die serum te verwyder sal sy ooreenstemmende lyn uit die spektrum verdwyn. As alternatief kan die konsentrasie van die komponent in die antigeenmengsel verhoog word, in welke geval sy ooreenstemmende lyn

van posisie sal verander.

In sy wysiging van hierdie tegniek het Polson 'n eenvoudige apparaatjie ontwerp wat die afsonderlike proefbuisies vervang (fig. 2). Dit bestaan uit drie „Perspex”-stafies waardeur 'n reeks gaatjies geboor is, op so 'n wyse dat, wanneer die stafies netjies opmekaar gepas word, die gaatjies in al drie perfek saamval en sodoende 'n reeks klein proefbuisies simuleer. Die reeks gaatjies in die onderste stafie verteenwoordig dan die onderste deel van Oudin se proefbuisies hierbo genoem en word dus gevul met die antiserum. Die gaatjies deur die middelste en boonste stafies verteenwoordig die middelste en boonste dele van Oudin se proefbuisies en word onderskeidelik met agargel en 'n stygende reeks verdunnings van die antigeenoplossing gevul. Dit vergemaklik en bespoedig die opstel van die eksperiment, dit maak die gebruik van kleiner hoeveelhede antiserum en antigeen moontlik en in al die buisies is die agarkolom ewe lank sodat meer akkurate metinge van die posisies van die lyne gemaak kan word. Benewens al die gegewens, soos deur die Oudintegniek verskaf, kan in hierdie geval m.b.v. metinge die diffusiekonstante van elke komponent bereken word. Op sy beurt is die diffusiekonstante een van die gegewens wat nodig is vir berekening van die molekulêrgewig van die bestanddeel.

Ouchterlonytegniek. In beginsel stem dit ooreen met die Oudintegniek met dié verskil dat diffusie in 'n dun laag agargel in 'n horisontale in plaas van 'n vertikale vlak plaasvind. 'n Agarlagie ongeveer 2 mm. dik word op

'n glasplaat, wat waterpas lê, gegiet. Na stolling word 'n gaatjie, 2 mm. in deursnee, in die agar gemaak en rondom hierdie gaatjie word 'n reeks gaatjies, net so groot en almal op dieselfde afstand daarvandaan, gemaak (fig. 3a). Die sentrale gaatjie word met antiserum gevul en die ander met die antigeenmengsel of omgekeerd. Albei vloeistowwe diffundeer in alle rigtings deur die agar en waar teenliggaam en antigeen mekaar in optimale verhouding ontmoet word 'n lyn van presipitaat gevorm. Dieselfde gegewens as met die Oudintegniek kan dus hieruit verkry word. Daarbenewens is dit moontlik om twee verskillende antigeenmengsels teen dieselfde antiserum te laat diffundeer ten einde vas te stel of een of meer gemeenskaplike komponente in albei aanwesig is. Indien albei mengsels een komponent met mekaar in gemeen het neig die lyne na mekaar toe en verenig om 'n aaneenlopende boog te vorm (fig. 3b). Is die komponente nie dieselfde nie, dan stoot die lyne mekaar af of kruis mekaar (fig. 3c).

Immuno-elektroforese. Gerieflikheidshalwe word dit onder Elektroforese bespreek.

(d) Skeiding en identifikasie van die antigeniese bestanddele.

Ten einde die verskillende antigene in die mengsel te kan identifiseer moet hulle van mekaar geskei word sodat elkeen in 'n suiwer vorm verkry kan word. Dit kan onder andere deur ultrasentrifugering en elektroforese bewerkstellig word.

Ultrasentrifugering. Dit berus op die verskil in die sedimentasiekonstante van die verskillende komponente en dié

hang weer af van die molekulêre gewig en -grootte van die bestanddele. Deur die mengsel teen verskillende baie hoë snelhede te sentrifugeer sak die verskillende komponente by verskillende snelhede uit, die swaar bestanddele eerste teen laer snelhede en daarna die ligter bestanddele teen hoër snelhede. Indien die verskil in sedimentasiekonstante groot genoeg is kan die bestanddele op hierdie wyse redelik suiwer verkry word.

Elektroforese. Die molekule van proteïen en ander organiese verbindings dra positiewe of negatiewe elektriese ladings. Wanneer hierdie verbindings, in 'n geskikte bufferoplossing met die verlangde pH, aan die deursending van 'n elektriese stroom onderwerp word, migreer hulle in die rigting van die positiewe of negatiewe pool al na gelang van die lading wat hulle dra. Dit staan bekend as elektroforese en die snelheid waarteen hulle beweeg staan bekend as elektroforetiese beweeglikheid. In 'n mengsel het die verskillende bestanddele gewoonlik verskillende snelhede van elektroforetiese beweeglikheid en as hulle aan elektroforese onderwerp word sal hulle na 'n bepaalde tyd van mekaar skei en op verskillende plekke in die elektroforetiese kolom aanwesig wees. Hieruit kan hulle dan redelik suiwer verkry word. Op hierdie wyse is normale menslike serum reeds in ses verskillende fraksies geskei, t.w. die twee hoofbestanddele albumien en globulien, waarvan laasgenoemde in vyf verskillende fraksies opgebreek is. Op soortgelyke wyse is dit moontlik om ook die samestellende antigene in 'n mengsel te skei.

Immuno-elektroforese berus op dieselfde beginsel met dié verskil dat elektroforese nie in 'n vertikale vloeistofkolom plaasvind nie maar wel in 'n dun agarlagie op 'n glasplaat in 'n horisontale vlak (fig. 4). 'n Gaatjie (A) van 1 mm. deursnee in die agarlaag word met die antigeenmengsel gevul en 'n elektriese stroom word deur die agarlaag gestuur vir een uur of langer. Daarna word 'n groefie (B1 en B2), 1 mm. breed, in die agar gemaak, 5 mm. weg van die gaatjie af en parallel met die rigting van die stroomvlei. Die groefie word met die homoloë antiserum gevul en lg. diffundeer in 'n rigting

loodreg met die groef. Vanuit die punt waar die antigeenkomponent hom na elektroforese bevind diffundeer dit in alle rigtings en waar dit sy spesifieke teenliggame ontmoet word 'n lyn van presipitaat gevorm. Weer is die aantal lyne wat gevorm word 'n aanduiding van die aantal antigene wat in die mengsel aanwesig is.

Nadat die bestanddele op een van die bogenoemde maniere geskei is kan hulle met behulp van chemiese toetse of deur papierkromatografie geïdentifiseer word.

D. VAN EEDEN.

P.U. vir C.H.O.

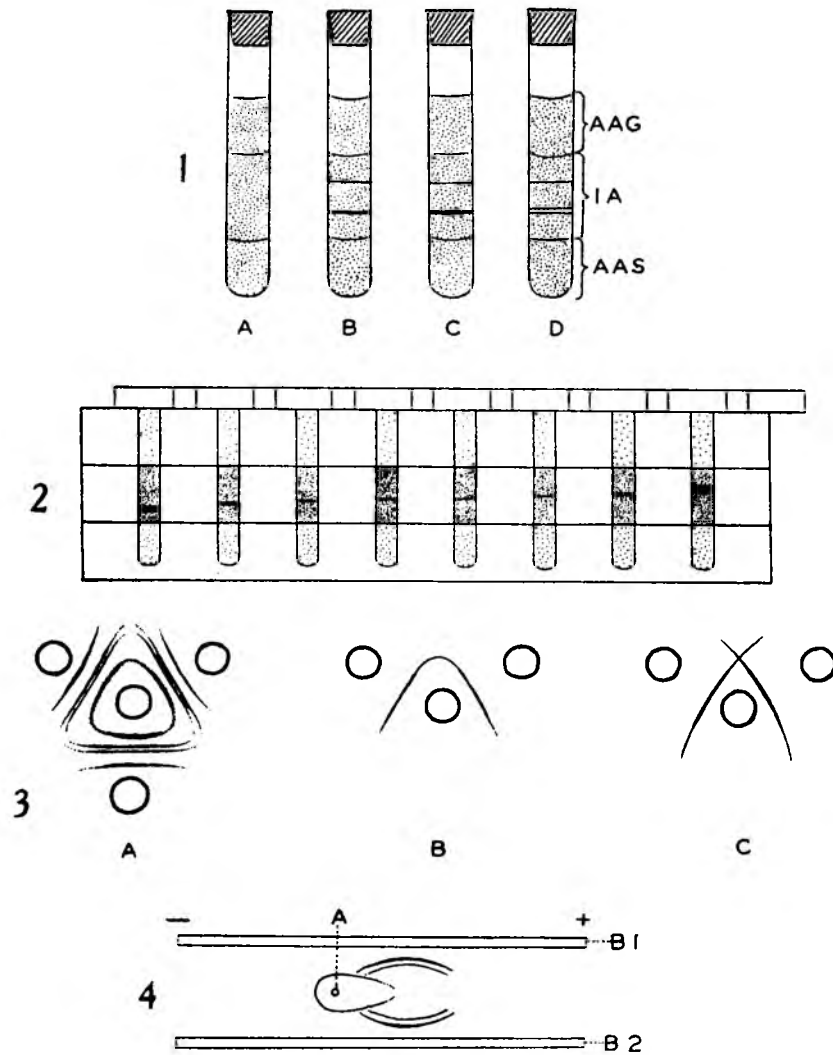


Fig. 1. Voorstelling van resultate soos m.b.v. die Oudintegniek verkry; A, 0 uur; B, na 24 uur; C, na 36 uur; D, na 48 uur; AAG, agar-antigeenmengsel; 1 A, 1% agar; AAS, agar-antiserummengsel.

Fig. 2. Lyne van presipitaat soos in Polson se apparaat waargeneem. Let

op hoe lynbreedte en -posisie met stygende antigeenverduunning verander.

Fig. 3. Voorstelling van resultate soos met Ouchterlonytegniek verkry.

Fig. 4. Voorstelling van resultate soos m.b.v. immuno-elektroforese verkry.