

ORIGINALNI NAUČNI RADOVI ORIGINAL STUDIES

Zavod za transfuziju krvi, Novi Sad

Originalni naučni rad

Original study

UDK 612.118:616.921.5-002.6:616.15.1

INHIBITORNA AKTIVNOST M I N KRVNOGRUPNIH ANTIGENA U REAKCIJI INHIBICIJE VIRUSNE HEMAGLUTINACIJE SA VIRUSOM INFLUENCE

INHIBITORY ACTIVITY OF M AND N BLOOD GROUP ANTIGENS IN INHIBITION REACTION OF VIRAL HEMAGGLUTINATION BY INFLUENZA VIRUS

Svetlana VOJVODIĆ

Sažetak - M i N krvnogrupsni antigeni ispoljavaju inhibitornu aktivnost u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa pojedinim sojevima virusa influence zahvaljujući prisustvu rezidua sijaline kiseline u sastavu glikoforina na površini humanih eritrocita, koji predstavljaju specifične hemaglutinacione receptore i supstrat za dejstvo virusnog enzima neuraminidaze. U radu je testirana reaktivnost humanih eritrocita O krvne grupe MM i NN fenotipa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa virusom influence A₂ Singapur, sa ciljem utvrđivanja mogućnosti upotrebe humanih eritrocita u virusnoj hemaglutinaciji, određivanju njihove reaktivnosti u titraciji, retitraciji hemaglutinina i samoj reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije. Ispitivanje ima za cilj da se utvrde razlike u pogledu brzine reagovanja i receptorskog kapaciteta eritrocita različitih u MN fenotipu i uticaj istih eritrocita na ishod reakcije inhibicije virusne hemaglutinacije. Materijal na kome je izvršeno ispitivanje reaktivnosti eritrocita obuhvata obradu 69 seruma osoba inficiranih ili prokuženih virusom influence od kojih je 32 dalo pozitivnu reakciju, tj. titrove 1/80 i više. Rezultati ispitivanja su pokazali da je reaktivnost eritrocita različitih u MN fenotipu jednaka u pogledu brzine reagovanja i receptorskog kapaciteta u titraciji, retitraciji hemaglutinina i reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa virusom influence A₂ Singapur, da daju fenomen virusne hemaglutinacije za razliku od papainizovanih eritrocita koji ne sadrže M i N krvnogrupsne antigene, što indirektno govori da M i N krvnogrupsni antigeni sadrže receptore za virus influence.

Ključne reči: krvne grupe + imunologija; virusni inhibitori; virusni hemaglutinini; virusni antigeni; influenza; MNSS sistem krvnih grupa; inhibitorni testovi hemaglutinacije

Uvod

Jedna od osobina koje ispoljavaju M i N krvnogrupsni antigeni jeste inhibitorna aktivnost u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije u čijoj osnovi leži fenomen virusne hemaglutinacije koji je posledica interakcije receptora na humanim eritrocitima i virusnog hemaglutinina.

Springer i Ansel [1] 1958. godine i Makella i Cantell nezavisnim ispitivanjima dolaze do prvih evidentnih dokaza da pojedini sojevi tipa A i B (Melburn soj A tipa, Lee soj B tipa, S 15 soj svinjskog virusa influence) virusa influence inaktiviraju M i N antigene na humanim eritrocitima. Ovi autori su dokazali da delovanjem enzima neuraminidaze humani eritrociti postaju neaglutinabilni sa anti-M i anti-N antiserumima i zaključili da su rezidui sijaline kiseline receptorska mesta za virus influence [2]. Nakon izolacije sijaloglikoproteina iz strome humanih eritrocita od strane Baranowskog 1959. godine, Klenka i Uhlenrucka iz 1960, Kathana [3] iz 1961. godine i Nagaia i Springera iz 1962. godine, zapaženo je da M i N antigene specifičnosti kao delovi sijalogliko-

proteina pokazuju inhibitornu aktivnost u reakciji virusne hemaglutinacije sa influenza virusom [1,2,4].

Zuckerman i saradnici [5], vršeći disocijaciju MNSs antigena upotrebom natrijum-deoksiholatne ekstrakcije delova eritrocitne membrane, našli su da frakcije pripremljene od donora homozigotnih za Ms i heterozigotnih za MNS, sadrže receptore za virus influence, kao i da prečišćeni pripravak od N antigena inhibira hemaglutinacionu aktivnost virusa influence. Radovima Dahra [6] iz 1986. godine dokazano je da hemaglutinaciona aktivnost pojedinih sojeva virusa influence može biti inhibirana glikoforinom A.

Ispitivanjem interakcije virusa influence sa glikoproteinima eritrocita želelo se da se izoluje visokopotentni inhibitor virusne hemaglutinacije, s ciljem da se odrede njegove osobine i uporedi hemijski sastav sa drugim eritrocitnim glikoproteinima. Radovima Paulsona i saradnika [7] dokazano je da su strukture koje poseduju inhibitornu aktivnost za virusnu hemaglutinaciju M i N krvnogrupsni antigeni koji sadrže sijalinu kiselinu kao esencijalnu komponentu receptorskog mesta influenza virusa.

Marchesi, Furthmayr i Tomita [2] dokazali su da su, takode, receptorna mesta na površini eritrocita,

Skrćenice

RDE - receptor destroying enzyme

koja su odgovorna za vezivanje virusa influence, rezidue sijaline kiseline, koje su sastavni deo glikoforina A i B. S obzirom na to da je njih moguće otkloniti delovanjem enzima neuraminidaze i pronaze, dokazana je proteinska priroda eritrocitnih receptora za virus influence [8].

U prilog tvrdnji da su M i N antigeni zaslužni za vezivanje virusa influence, pošto sadrže rezidue sijaline kiseline i osetljivi su na porteolizno dejstvo neuraminidaze, ide i činjenica da delovanjem ovog enzima ne dolazi do gubitka aglutinabilnosti nijednog drugog krvnogrupnog antigena osim M i N [9].

Ova ispitivanja, usmerena na otkrivanje prirode eritrocitnih receptora za viruse, usklađena su sa saznanjima iz oblasti virusologije čiji je predmet razmatranja priroda receptora na virusima koji ispoljavaju fenomen virusne hemaglutinacije.

Fenomen virusne hemaglutinacije otkrili su Hirst i, nezavisnim radovima, McClelland i Hare, 1941. godine [10-15]. Pojava virusne aglutinacije zapažena je prilikom razmnožavanja virusa influence u embrionisanim kokošijim jajima. Autori su приметili da tokom inokulacije virusa influence u alantoisnu kesu dolazi do povrede krvnih sudova i dodira kokošijih eritrocita sa amnionskom i alantoisnom tečnošću u kojoj se nalazi virus, pri čemu dolazi do pojave slepljivanja eritrocita i virusnih partikula, koji formiraju mrežu ili hemaglutinat [10, 12].

Priroda ove pojave je izučena i objašnjena i nastaje kao posledica osobine i sposobnosti nekih virusa da aglutiniraju eritrocite pojedinih životinjskih vrsta, ptica, ili humane eritrocite. Zasnovana je na posredovanju specifičnih hemaglutinina na površini virusne čestice i specifičnih receptora na površini eritrocita. Virus influence i većina predstavnika porodice *Paramyxoviridae* poseduju antigen hemaglutinin, kao sastavni deo ovojnice virusa, koji je po hemijskom sastavu glikoprotein. To je tzv. H antigen, a humane loze virusa influence sadrže jedan od sledeća četiri suptipa H antigena: H0, H1, H2 i H3.

Virus influence vezuje se svojim hemaglutininom za mukoproteinske receptore na eritrocitima, koji sadrže N-acetilneuraminsku (sijalinu) kiselinu, što predstavlja prvu fazu fenomena virusne hemaglutinacije, u kojoj dolazi do aglutinacije eritrocita. Posle vezivanja za specifične receptore virus influence deluje svojim drugim površinskim antigenom, neuraminidazom, na sijalinu kiselinu eritrocitnih receptora i enzimskim delovanjem razara receptorna mesta na površini eritrocita, nakon čega dolazi do spontane elucije neoštećeni virusnih partikula. Humane loze virusa influence sadrže jedan od sledećih suptipova N antigena: N1, N2 i N3 [10].

Humani eritrociti 0 krvne grupe sadrže rezidue sijaline kiseline kao sastavni deo M i N antigena, koje predstavljaju receptorska mesta za hemaglutinin virusa. Isti eritrociti tretirani proteoliznim enzimima, kao što su papain, ficin, himotripsin, tripsin, pronaza i nauraminidaza [5, 16, 17] koji destruišu sijaloglikoproteine i M i N antigene, ne ispoljavaju fenomen virusne hemaglutinacije, jer oštećeni sijaloglikoproteini ne poseduju receptore za virus influence.

Materijal i metode

Materijal na kome je sprovedeno ispitivanje reaktivnosti humanih eritrocita 0 krvne grupe MM i NN genotipa, obuhvatio je obradu 69 seruma osoba prokuženih ili inficiranih virusom influence, od kojih je 32 uzorka dalo pozitivnu reakciju odnosno titrove 1/80 i više što se smatra zaštitnim titrom za virus influence naročito kod starijih osoba [17, 18]. U radu je korišćen virus influence A₂ Singapur, proizveden - razmnožen u virusološkoj laboratoriji Sektora za virusologiju.

U radu su korišćene dve vrste humanih eritrocita 0 krvne grupe, sa razlikom u pogledu fenotipa MN krvnogrupnih sistema, pri čemu jedna vrsta poseduje MM fenotip u homozigotnoj formi, a druga NN. Kao negativna kontrola, upotrebljeni su papainizovani eritrociti, dobijeni mešavinom krvi od više osoba 0 krvne grupe, koji su tretirani enzimom papainom, nakon mešanja jednakih količina rastvorenog liofilizovanog papaina sa eritrocitima, i inkubacije od 10 minuta na 37°C. Kontrolni, papainizovani eritrociti ne sadrže receptore za virus influence, budući da papain destruiše M i N krvnogrupne antigene.

Pre izvođenja testa ispitivani serum se priprema u smislu otklanjanja nespecifičnih inhibitora reakcije, i to tako što se 25 µl seruma pomeša sa 75 µl RDE (*Receptor Destroying Enzyme*), porekla od *Vibrio cholerae* a potom inkubira u termostatu na 37°C, nekoliko sati, zatim inkubira na 56°C u vodenom kupatilu, posle čega se razređuje sa 150 µl fiziološkog rastvora.

Princip reakcije inhibicije virusne hemaglutinacije sastoji se u tome da se mešaju dvostruka stepenasta razređenja bolesničkog seruma sa virusnim antigenom i, ukoliko u ispitivanom serumu postoje antitela na virus influence, ona će se u prvom delu reakcije vezati za hemaglutinine virusa. Time će oni biti blokirani i nastupiće inhibicija hemaglutinacije, sa odsustvom fenomena virusne hemaglutinacije, po dodatku odgovarajućih eritrocita. U obrnutom slučaju, ukoliko u ispitivanom serumu ne postoje antitela na virus influence, u prvom delu reakcije neće nastupiti vezivanje antitela iz seruma i hemaglutinina virusa, koji će tako biti slobodni za vezivanje sa receptorima na eritrocitima u drugom delu reakcije i davaće virusnu hemaglutinaciju.

Negativna kontrola humanih eritrocita, koja podrazumeva upotrebu papainizovanih eritrocita, treba da pokaže da eritrociti sa oštećenim receptorima za virusni hemaglutinin ne daju virusnu hemaglutinaciju, nego se samo talože. U toku rada mikrometodom mogu se uključiti i pozitivna i negativna kontrola, koje sadrže pozitivan i negativan serum, kao i kontrola virusa koja ima za cilj da potvrdi stvarnu količinu upotrebljenog virusa (od 8 hemaglutinacionih jedinica na 50 μ l).

Srednja geometrijska vrednost titra antitela

Za određivanje srednje geometrijske vrednosti titra antitela korišćena je sledeća formula:

$$x = \frac{\sum (f \log x)}{f}, \text{ uz antilogaritmovanje dobijene vrednosti,}$$

gde je:

$\sum$ = srednja geometrijska vrednost titra antitela;

f = broj seruma;

x = dobijeni titar.

Rezultati

Rezultati ispitivanja reaktivnosti humanih eritrocita u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati reakcije inhibicije virusne hemaglutinacije

Table 1. Reaction results of hemagglutination inhibition

Reakcija inhibicije virusne hemaglutinacije		
	n	%
Pozitivna reakcija	32	46,37
Negativna reakcija	37	53,63
Ukupno seruma	69	100,00

Tabela 1 pokazuje da je ukupan broj ispitivanih seruma osoba prokuženih virusom influence u reakciji inhibicije hemaglutinacije 69. Od tog broja, 32 seruma su bila pozitivna i vršila su inhibiciju virusne hemaglutinacije u razređenju koje je iznosilo 1/80 ili više. Trideset sedam seruma osoba pokazivali su niže titrove od 1/80 u reakciji inhibicije hemaglutinacije.

Tabela 2. Rezultati ispitivanja eritrocita MM fenotipa u titraciji hemaglutinina

Table 2. Results of investigation of MM red blood cells in hemagglutinin titration

Titar	1/640	1/320	1/160	1/80	x	SD	Mod
Br. uzor	1	20	7	4	1/236,3	79,103	1/320
Ukupno	32 uzorka			Kontrola eritrocita 0			
Koeficijent varijacije: 33,47%							

Rezultati prikazani u tabeli 2 pokazuju reaktivnost eritrocita MM fenotipa u titraciji hemaglutinina i ukazuju da od 32 pozitivna uzorka kod 20 uzoraka najmanje razređenje virusa koje je davalo virusnu hemaglutinaciju sa MM eritrocitima bilo 1/320, kod

sedam uzoraka 1/160, kod četiri 1/80 i kod jednog 1/640.

Kontrole eritrocita bile su negativne gde nije bilo fenomena virusne hemaglutinacije.

Tabela 3. Rezultati ispitivanja eritrocita NN fenotipa u titraciji hemaglutinina

Table 3. Results of investigation of NN red blood cells in hemagglutinin titration

Titar	1/640	1/320	1/160	1/80	1/40	X	SD	Mod
Broj uzor.	3	9	11	7	2	1/174,4	91,02	1/160
Ukupno	32 uzorka			Kontrola eritrocita: 0				
Koeficijent varijacije: 52,16%								

Rezultati prikazani u tabeli 3 pokazuju reaktivnost eritrocita NN fenotipa u titraciji hemaglutinina i ukazuju da je od 32 pozitivna uzorka kod 11 uzoraka najmanje razređenje virusa koje je davalo virusnu hemaglutinaciju sa NN eritrocitima bilo 1/160, kod devet uzoraka 1/320, kod sedam 1/80, kod tri 1/640 i kod dva 1/40. Kontrole eritrocita bile su negativne gde nije bilo virusne hemaglutinacije.

Tabela 4. Rezultati ispitivanja papainizovanih eritrocita u titraciji hemaglutinina

Table 4. Results of investigation of papainised red blood cells in hemagglutinin titration

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
0	0	0	0	0	0	0	0	0

Testirana je nulta hipoteza, da nema statističke značajnosti razlike srednjih geometrijskih vrednosti titra antitela, sa eritrocitima MM i NN fenotipa, u titraciji hemaglutinina. Nađena vrednost iznosi 1,071, dok je tablična vrednost na nivou signifikantnosti od $p < 0,05$, uz stepen slobode $V = n_1 + n_2 - 2(62) = 2,00$.

Papainizovani eritrociti kod kojih su destruisani M i N krvnogrupni antigeni, a samim tim i reziduc sijaline kiseline kao receptorska mesta za virus influence, nisu davali fenomen virusne hemaglutinacije, jer su se taložili u svim razređenjima.

Tabela 5. Rezultati ispitivanja eritrocita MM fenotipa u retitraciji hemaglutinina

Table 5. Results of investigation MM red blood cells in hemagglutinin retitration

Titar	1/70	1/50	1/45	1/40	1/35	1/25	1/10	X	SD	Mod
Broj uzor.	7	6	4	5	4	4	2	1/40,6	68,28	1/70
Ukupno	32 uzorka			Kontrola eritrocita: 0						
Koeficijent varijacije:167,84%										

U tabeli 5 uočava se da vrednosti radnih titrova u retitraciji hemaglutinina sa eritrocitima MM fenotipa i ukazuju da je od 32 pozitivna uzorka kod sedam radni titar bio 1/70, kod šest 1/50, kod četiri 1/45, kod pet 1/40, kod četiri 1/25 i kod dva 1/10.

Rezultati prikazani u tabeli 6 pokazuju vrednosti radnih titrova u retitraciji hemaglutinina sa eritrociti-

Tabela 6. Rezultati ispitivanja eritrocita NN fenotipa u retitraciji hemaglutinina**Table 6.** Results of investigation of NN red blood cells in hemagglutinin retitration

Titir	1/50	1/40	1/35	1/30	1/25	1/20	1/15	1/10	X	SD	Mod
Broj	7	3	4	6	3	5	2	2	1/28,9	39,14	1/50
uzor											
Ukupno	32 uzorka		Kontrola eritrocita: 0								
Koeficijent varijacije:	135,07%										

tima NN fenotipa i ukazuju da je od 32 pozitivna uzorka kod sedam radni titar bio 1/50, kod tri 1/40, kod četiri 1/35, kod šest 1/30, kod tri 1/25, kod pet 1/20, kod dva 1/15 i kod dva 1/10.

Testirana je nulta hipoteza da nema statističke značajnosti razlike srednjih geometrijskih vrednosti titra antitela, sa eritrocitima MM i NN, u retitraciji hemaglutinina. Nađena vrednost iznosi 0,827, dok je tablična vrednost na nivou signifikantnosti od $p < 0,05$, uz stepen slobode $V = n_1 + n_2 - 2(62) = 2,00$.

Tabela 7. Rezultati ispitivanja eritrocita MM fenotipa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa serumima osoba pozitivnih na virus influence**Table 7.** Results of investigation of MM red blood cells in inhibition reaction of hemagglutination by sera of influenza positive patients

Titir	1/640	1/320	1/160	1/80	X	SD	Mod
Broj	1	4	11	16	1/128,8	97,017	1/80
uzoraka							
Ukupno	32 uzorka			Kontrola eritrocita: θ			
Koeficijent varijacije:	75.30%						

Rezultati ispitivanja seruma osoba prokuženih virusom influence u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa humanim eritrocitima MM fenotipa ukazuju da je od 32 uzorka 16 seruma inhibiralo virusnu hemaglutinaciju u razređenju od 1/80, 11 u razređenju od 1/160, 4 u razređenju 1/320 i jedan u razređenju 1/640.

Rezultati ispitivanja seruma osoba prokuženih virusom influence u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa humanim eritrocitima NN fenotipa ukazuju da je od 32 uzorka 14 seruma vršilo inhibiciju virusne hemaglutinacije u razređenju od 1/80, 12 u razređenju 1/160, 3 u razređenju 1/320 i 3 u razređenju 1/640.

Tabela 8. Rezultati ispitivanja eritrocita NN fenotipa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa serumima osoba pozitivnih na virus influence**Table 8.** Results of investigation of NN red blood cells in inhibition reaction of hemagglutination by sera of influenza positive patients

Titir	1/640	1/320	1/160	1/80	X	SD	Mod
Broj	3	3	12	14	1/143,57	93,85	1/80
uzoraka							
Ukupno	32 uzorka			Kontrola eritrocita: 0			
Koeficijent varijacije:	65,37%						

Testirana je nulta hipoteza, da nema razlike srednjih geometrijskih vrednosti titra antitela, sa MM i NN eritrocitima u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije, i nađena vrednost iznosi: - 0,608, dok je tablična vrednost na nivou signifikantnosti od $p < 0,05$, uz stepen slobode $V = n_1 + n_2 - 2(62) = 2,00$.

Tabela 9. Pregled reaktivnosti eritrocita MM i NN fenotipa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije u odnosu na visine titrova**Table 9.** Reactivity of MM and NN red blood cells in inhibition reaction of hemagglutination whith comparison to titer levels

Reaktivnost eritrocita	Broj uzoraka	%
Iste vrednosti titrova	24	75
MM eritrociti u višem titru	2	6,25
NN eritrociti u višem titru	6	18,75
Ukupno	32	100,00

Rezultati ispitivanja reaktivnosti eritrocita MM i NN fenotipa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije ukazuju da su od 32 pozitivna uzorka kod 24 najveća razređenja seruma, koja su vršila inhibiciju, bila jednaka za obe vrste eritrocita, kod 6 uzoraka serumi prokuženih osoba inhibirali su virusnu hemaglutinaciju u većim razređenjima sa NN eritrocitima nego sa MM i da su kod 2 uzorka titrovi bili viši sa eritrocitima MM fenotipa. Testirana je statistička značajnost razlike visina titrova sa različitim eritrocitima MM i NN fenotipa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije. Nađena vrednost iznosi 0,25, dok je tablična vrednost na nivou signifikantnosti od $p < 0,05$, uz stepen slobode $V = 4$, jednaka 9,488.

Diskusija

Od ukupno 69 seruma osoba prokuženih ili vakcinisanih virusom influence, kod 32 je nađena pozitivnost u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije. U radu je ispitivana reaktivnost humanih eritrocita nulte krvne grupe fenotipa MM i NN u homozigotnoj formi, zbog fenomena doze i dobijanja jasnijih reakcija aglutinacije u duploj dozi.

Mnogobrojni literaturni podaci navode mogućnost upotrebe humanih eritrocita 0 krvne grupe u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa virusom influence [10,14,15]. Virusnu hemaglutinaciju, koja predstavlja osnovu ove serološke dijagnostičke metode, pored humanih eritrocita, mogu dati i eritrociti mnogih sisara i ptica, kao na primer: gvineja svinje, krave, konja, zamorca, rhesus majmuna, belog pacova, ovna, odraslih i jednodnevnih pilića, patke, golubova, gusaka.

Virusna hemaglutinacija je fenomen koji ima nekoliko podtipova, koji su razvrstani u zavisnosti od vrste korišćenih eritrocita, vrste virusa i njihovih hemaglutinina i ostalih uslova, kao što su temperatura, pH, sastav suspenzije.

Prvi tip virusne hemaglutinacije sa naknadnom spontanom elucijom daje virus influence i većina predstavnika porodice *Paramyxoviridae*. U ovu reakciju uključeni su virusni antigeni hemaglutinin i neuraminidaza, kojih ima više antigenih oblika.

Drugi tip virusne hemaglutinacije koji se odvija samo u specijalnim uslovima, i zavisi od pH, temperature i sastava suspenzije, daju adeno, arbo virusi, virus slinavke (šapa) i neki drugi životinjski virusi.

Treći tip virusne hemaglutinacije odvija se putem solubilnih hemaglutinina koji se odvajaju od virusne čestice, a daju ga članovi porodice *Poxviridae* (virus *variole vere*).

Pored pomenutih izvornih radova Hirsta, McClellanda i Harea koji su prvi opisali fenomen virusne hemaglutinacije i mogućnost upotrebe humanih eritrocita 0 krvne grupe u izvođenju virusne hemaglutinacije, postoje literaturni podaci novijeg datuma koji opisuju mogućnost upotrebe i drugih vrsta eritrocita u cilju određivanja specifičnosti hemaglutinacionih receptora i supstrata neuraminidaze influence A virusa.

Podaci izneti 1994. god. u radu autora Bauma i Conceria [19], koji su u cilju određivanja receptorske specifičnosti hemaglutinina virusa influence A H1N1 i H3N2, upotrebljavali eritrocite A krvne grupe, desializovane eritrocite i derivatisane eritrocite sa delimičnim sadržajem sijaline kiseline, ukazuju na mogućnost upotrebe i drugih krvnih grupa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije. U zaključku ovog rada stoji da su specifični hemaglutinacioni receptori molekule sijaline kiseline koje poseduju dva tipa veze: Neu Ac α -2,3 Gal, koji sadrži više sijaline kiseline nego Neu Ac α -2,6 Gal veza. Neu Ac- α 2,3 Gal veza sadrži 141-161 nmol/ml, a Neu Ac- α 2,6 Gal 30-50 nmol/ml sijaline kiseline. Dokazano je da A krvna grupa sadrži receptore za humane i laboratorijske sojeve virusa influence A, i da sa njima reaguje u istim titrovima [19].

Ovi rezultati koji potvrđuju mogućnost upotrebe eritrocita A krvne grupe u virusnoj hemaglutinaciji, u skladu su sa podacima o distribuciji i sadržaju sijaline kiseline u sastavu glikoforina na eritrocitima različitih fenotipova u ABO sistemu. Naime, u radu objavljenom 1991. god. u časopisu *Acta Physiologica Hungarica*, volumen 78 [3], izneseni su rezultati o nejednakom sadržaju sijaline kiseline kod eritrocita različitog fenotipa u ABO sistemu.

Ispitivani su eritrociti krvnih grupa 0 negativna, AB negativna, AB pozitivna i B negativna. Po rezultatima ovog rada, sadržaj sijaline kiseline je značajno različit kod eritrocita 0 krvne grupe u odnosu na AB i B, jer su vrednosti sijaline kiseline za 0 RhD pozitivnu krvnu grupu $52,73 \pm 2,2 \mu\text{mol}$, $34,77 \pm 1,16 \mu\text{mol}$ za AB RhD negativnu, $32,88 \pm 1,52 \mu\text{mol}$ za AB RhD pozitivnu i $21,23 \pm 0,84 \mu\text{mol}$ za B RhD

negativnu, i potvrđuju činjenicu da je zbog prisustva sijaline kiseline na površini tih eritrocita moguće i njih upotrebiti u virusnoj hemaglutinaciji sa virusom influence. Takođe se u činjenici da je sadržaj sijaline kiseline kod eritrocita 0 krvne grupe najveći u poređenju sa ostalim krvnim grupama u ABO sistemu nalazi objašnjenje i njihove upotrebe u rutinskom laboratorijskom radu sa virusom influence, jer su zbog toga oni najprikladniji za korišćenje [20].

Zahvaljujući analiziranju relativnog sadržaja N Ac- α 2,3 Gal i N Ac- α 2,6 Gal veza, na eritrocitima različitih životinjskih vrsta, upotrebom fluorescentno aktivisanih lektina (*Sanbucus nigra* je aglutin za N Ac- α 2,6 Gal, a *Maackia amurensis* za N Ac- α 2,3 Gal), pokazana je sposobnost influence A virusa da aglutinira eritrocite različitih životinjskih vrsta koja je zavisna od specifičnosti njihovih receptora.

Ovi rezultati ukazuju da relativna zastupljenost Neu Ac - α 2,3 Gal i Neu Ac- α 2,6 Gal veza na različitim eritrocitima determiniše da li će eritrociti biti aglutinirani virusima putem njihovih specifičnih veza. Eritrociti različitih životinjskih vrsta ispoljavaju razlike u oligosaharidnoj kompoziciji, odnosno sadržaju oligosaharidnih lanaca na površini eritrocita. Tako, eritrociti pilića i ljudi sadrže samo N-acetil (sijalinu) neuraminsku kiselinu, dok eritrociti konja i krava, sadrže pretežno N-glycolyl sialinu kiselinu (Neu Gc 100% kod konja i 93% kod krava). Bovini i ekvini eritrociti poznati po pretežnom sadržaju Neu Gc (N-glycolyl sialine kiseline), zbog takvog oligosaharidnog sastava, mogu biti aglutinirani ptičijim ekvinim ali ne i humanim izolatima virusa [19].

Rezultati ispitivanja humanih eritrocita 0 krvne grupe, fenotipa MM i NN u titraciji hemaglutinina sa virusom influence A₂ Singapur, pokazuju da obe vrste upotrebljenih eritrocita daju virusnu hemaglutinaciju. Od 32 pozitivna seruma, MM eritrociti su davali virusnu hemaglutinaciju u razređenjima hemaglutinina virusa od 1/640 do 1/80, od kojih je jedan uzorak imao titar 1/640, dvadeset uzoraka 1/320, sedam uzoraka 1/160 i četiri uzorka 1/80. Najveći broj uzoraka (20) davao je virusnu hemaglutinaciju u razređenju od 1/320.

NN eritrociti su u titraciji hemaglutinina davali virusnu hemaglutinaciju u razređenjima od 1/640 do 1/40, i to tri uzorka u titru 1/640, devet uzoraka 1/320, jedanaest u titru 1/160, sedam u titru 1/80 i dva uzorka u titru 1/40. Najveći broj uzoraka (11) imao je titar 1/160.

Srednje geometrijske vrednosti titrova antitela MM i NN eritrocita u titraciji hemaglutinina nisu pokazale statističku značajnost razlike titrova sa dvema vrstama upotrebljenih eritrocita, što govori o ujednačenoj reaktivnosti ispitivanih eritrocita, kao i njihovom istovetnom receptorskom kapacitetu.

Ova činjenica je u skladu sa literaturnim navodima koji iznose podatke o količinama sijaline kise-

line na eritrocitima 0 krvne grupe MM i NN fenotipa, koji su ispitivani kao receptori za virus influence A₂. Prema rezultatima tih ispitivanja [2,21], nađena je približno ista količina sijaline kiseline na površini 0 MM i 0 NN eritrocita, tačnije, sadržaj sijaline kiseline 0 MM eritrocita je 20,06 μ mola, a 0 NN eritrocita 22,97 μ mola, što objašnjava ujednačenu reaktivnost dvaju upotrebljenih eritrocita u titraciji hemaglutinina.

Pored redovnih kontrola eritrocita primenjenih u svim fazama rada, koje treba da pokažu da nema aglutinacije samih eritrocita i fiziološkog rastvora, u titraciji hemaglutinina korišćeni su i papainizovani eritrociti kao negativna kontrola. Papainizovani eritrociti pripremani su tretiranjem sa enzimom papainom, čije je proteolizno dejstvo na membranu eritrocita poznato od 1946. godine [22].

Pošto papain proteolizno razara pomenute strukture MN glikoforina, njegovim razornim dejstvom bivaju otklonjene i rezidue sijaline kiseline koje su utkane u oligosaharidne lance MN glikoforina. Ova činjenica objašnjava nemogućnost reagovanja papainizovanih eritrocita u titraciji hemaglutinina sa virusom influence A₂ Singapur i izostajanje virusne hemaglutinacije sa istim virusom. Papainizovani eritrociti su zbog toga što ne sadrže receptore za virus influence korišćeni kao negativna kontrola. U titraciji hemaglutinina virusa influence A₂ Singapur nisu davali virusnu hemaglutinaciju jer su se taložili u svim razređenjima.

U reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije ispitivani su eritrociti 0 krvne grupe MM i NN fenotipa, pri čemu je testirana njihova sposobnost da se vežu i aglutiniraju hemaglutinine virusa influence A₂ Singapur, koji je prethodno bio u kontaktu sa serumima osoba pozitivnih na virus influence koji sadrže specifična antivirusna antitela.

Eritrociti MM fenotipa inhibirali su virusnu hemaglutinaciju u razređenjima seruma od 1/640 do 1/80, pri čemu je 11 uzoraka od 32 pozitivna imalo titar 1/160. Eritrociti NN fenotipa inhibirali su virusnu hemaglutinaciju u razređenjima seruma od 1/640 do 1/80, pri čemu je 14 uzoraka od 32 pozitivna imalo titar 1/80.

Statističkom obradom podataka, kojom su poređene srednje geometrijske vrednosti titrova antitela dobijenih u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije sa eritrocitima MM i NN fenotipa, nisu uočene statistički značajne razlike dobijenih vrednosti, što govori o ujednačenoj receptorskoj moći upotrebljenih vrsta eritrocita i njihovoj jednakoj reaktivnosti sa virusom influence A₂ Singapur.

Upoređivanjem visina titrova, dobijenih pri upotrebi obe vrste eritrocita u titraciji hemaglutinina, nađeno je da je od 32 pozitivna uzorka 15 imalo iste vrednosti titrova sa MM i NN eritrocitima. Kod 13 uzoraka od 32 pozitivna, MM eritrociti su pokazivali

više titrove u titraciji hemaglutinina u odnosu na NN eritrocite, a kod 4 uzorka od 32 ti titrovi su bili viši u odnosu na titrove MM eritrocita. Dobijene razlike u visinama titrova MM i NN eritrocita u titraciji hemaglutinina nisu statistički značajne, što govori o istovetnom receptorskom kapacitetu upotrebljenih vrsta eritrocita u odnosu na virus influence A₂ Singapur.

Upoređivanjem visina titrova dobijenih upotrebom obe vrste eritrocita u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije, nađeno je da su od 32 pozitivna seruma kod 24 seruma visine titrova sa MM i NN eritrocitima jednake, da su kod 2 seruma visine titrova više pri upotrebi MM eritrocita i da su kod 6 seruma visine titrova više pri upotrebi NN eritrocita.

Testirana je statistička značajnost razlike dobijenih vrednosti titrova u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije kod obe vrste eritrocita. Nađene razlike u visinama titrova kod obe vrste eritrocita, nisu statistički značajne, što ukazuje na istovrsnu reaktivnost eritrocita različitog fenotipa u MN sistemu sa virusom influence A₂ Singapur.

Rezultati ovog rada pokazuju da upotreba humanih eritrocita 0 krvne grupe u titraciji hemaglutina virusa influence A₂ Singapur rezultira virusnom hemaglutinacijom sa eritrocitima MM i NN fenotipa. Takođe je pokazano da obe vrste eritrocita imaju istu reaktivnost u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije i da pokazuju jednak uticaj na njen tok i ishod.

Zaključak

Humani eritrociti 0 krvne grupe MM i NN fenotipa daju fenomen virusne hemaglutinacije sa virusom influence A₂ Singapur, i zahvaljujućoj sposobnosti mogu biti rutinski upotrebljavani u laboratorijskom radu.

Reaktivnost eritrocita 0 krvne grupe MM i NN fenotipa u titraciji hemaglutinina jednaka je u pogledu brzine reagovanja i receptorskog kapaciteta sa virusom influence A₂ Singapur.

Papainizovani eritrociti sa virusom influence ne daju fenomen virusne hemaglutinacije zbog odsustva virusnih receptora na površini eritrocita koji su destruisani delovanjem papaina na molekul glikoforina A.

Receptorska mesta za virus influence na površini humanih eritrocita sastavni su deo krvnogrupnih antigena M i N koji bivaju destruisani delovanjem enzima papaina.

Eritrociti 0 krvne grupe MM i NN fenotipa u reakciji inhibicije virusne hemaglutinacije pokazuju jednaku reaktivnost, a razlike u visinama titrova kod obe vrste korišćenih eritrocita nisu statistički značajne.

Različite vrste eritrocita 0 krvne grupe u pogledu MN fenotipa pokazuju isti uticaj na rezultat reakcije inhibicije virusne hemaglutinacije.

Literatura

1. Springer GF, Ansell NJ. Inactivation of human erythrocyte agglutinogens M and N by influenza viruses and receptor-destroying enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 1958;44:182-9.
2. Issitt PD. *Applied blood group serology*. 3rd ed. Miami: Montgomery Scientific Publications, 1985:316-74.
3. Kathan RH, Winzler J, Johnson CA. Preparation of an inhibitor of viral hemagglutination from human erythrocytes. *J Exp Med* 1961;37:37-45.
4. Fukuda M, Osawa T. Isolation and characterization of a glycoprotein from human group O erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1973;248 (14):5100-5.
5. Zuckerman SH, Douglas DS, Nusbacher J. Dissociation of MNSs antigens using sodium deoxycholate fraction of erythrocyte membranes. *Vox Sang* 1975;28:200-6.
6. Mollison PL. *Blood transfusion in clinical medicine*. 8th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1987:383-93.
7. Carroll SM, Hiha HH, Paulson JC. Different cell-surface receptor determinants of antigenically similar influenza virus hemagglutinins. *J Biol Chem* 1981;256 (XVI):8357-63.
8. Marchesi VT, Furthmyr H, Tomita M. Molecular features of a sialoglycoprotein at the human erythrocyte membrane which carries influenza virus receptors. In: Beers RF, Bassett EG, eds. *Cell Membrane Receptors for Viruses, Antigens and Antibodies, Polypeptide Hormones, and Small Molecules*. New York: Raven Press, 1975:217-22.
9. Bird GWG, Wingham J. N-Acetylneuraminic (Sialic) acid and human blood group antigen structure. *Vox Sang* 1970;18:240-3.
10. Patić-Jerant V. *Medicinska virusologija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1995:18-532.
11. McClelland L, Hare R. The adsorption of influenza virus by red cell and a new in vitro method of measuring antibodies for Influenza virus. *Can J Public Health* 1941;32(11):530-8.
12. Brudnjak Z. *Medicinska virusologija*. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada, 1987:23-174.
13. Likar M. *Pregled medicinske virusologije*. Ljubljana, 1970:50-131.
14. Stuart-Harris CH. Influenza, common cold and other acute respiratory infections. In: Bedson SP, Downie AW, McCallum F, eds. *Virus and Rickettsial Diseases* 1950:28-213.
15. Terzin A. *Osnovi medicinske virusologije*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1955:35-65.
16. Walker RH. *Technical Manual*. 11th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1993:189-201:259-66.
17. World Health Organisation: Studies with inactivated influenza virus vaccines. *Weekly epidemiological record* 1998;73(40):305-12.
18. Mendell GL, Douglas RG, Bennett JE. *Principles and practice of infectious diseases*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1546-55.
19. Coucero JNSS, Baum LG. Characterization of the hemagglutinin receptor specificity and neuraminidase substrate specificity of clinical isolates of human influenza A viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 1994;89(4):587-91.
20. Udoh AE. Distribution of sialic acid between sialoglycoproteins and other membrane components of different erythrocyte phenotypes. *Acta Physiol Hungarica* 1991;78(3):265-73.
21. Ohya K, Yamauchi S, Endo T, Ohkama S. Presence of influenza virus reactive glycoproteins other than glycoprotein A in human erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Com* 1991;178(1):79-84.
22. Boorman KE, Dodd BE. *An introduction to blood group serology*. 4th ed. Edinburgh and London. 1973:85-406.

Summary

Introduction

M and N blood group antigens demonstrate inhibitory activity in inhibition reaction of viral hemagglutination with some influenza virus strains, with help of N-acetylneuraminic acid (sialic acid) which occurs in glycoproteins on the red blood cells surface, and represent specific hemagglutination receptors and substrate for action of influenza virus neuraminidase.

Material and methods

Reactivity of human O red blood cells with MM and NN phenotypes is established in inhibition reaction of viral hemagglutination by influenza virus A₂ Singapore, with intention to fortify possibility of using human red blood cells in viral hemagglutination, to determine their reactivity in titration, retitration of hemagglutinins and inhibition reaction of hemagglutination. The aim of investigation was to describe destinations between different red blood cells in view of speed of reaction and receptor capacity. Material included 69 samples of sera from persons infected with influenza virus, among them 32 samples were positive with titres 1/80 and more.

Results

Reactivity of erythrocytes with MM and NN phenotypes in titration of hemagglutinins of influenza virus A₂ Singapore in

which base is viral hemagglutination is identical, because there are no statistically significant differences of average geometrical levels of antibody titers. Enzymatically derived red cells by papain, which do not contain M and N blood group antigens, not cause viral hemagglutination phenomenon, because they sediment in all dilutions. Reactivity of red blood cells with MM and NN phenotypes in retitration of hemagglutinins and inhibition reaction of hemagglutination is identical, because there are no statistically significant differences in results with two kinds red blood cells.

Discussion

Results of investigation revealed that the reactivity of O human red blood cells different in MN phenotype is identical in regard to speed of reaction and receptor capacity in titration, retitration and inhibition reaction of viral hemagglutination and also showed that they demonstrate viral hemagglutination phenomenon in contrast with papainised red blood cells which do not contain M and N blood group antigens, which indirectly means that M and N blood group antigens contain receptors for influenza virus.

Conclusions

Human red cells with MM and NN phenotypes cause viral hemagglutination phenomenon with influenza virus A₂ Singapore, and could be used in routine virusological diagnostic procedures. O blood group red cells (MM and NN) in reaction of viral hemagglutination result identically in view of speed of reaction and receptor capacity, and have the same impact on

result of this reaction. Enzymatically derived red cells by papain do not cause viral hemagglutination phenomenon, because they do not contain receptors for viral hemagglutinin on red cell membrane surface, which are hydrolized by papain. Receptors for influenza virus on red cell membrane surface are a component part of M and N blood group antigens which are destroyed by papain.

Key words: Blood Groups + immunology; Virus Inhibitors; Hemagglutinins, Viral; Antigens, Viral; Influenza; MNSS Blood-Group System; Hemagglutination Inhibition Tests

Rad je primljen 8. VII 1999.

Prihvaćen za štampu 15. VII 1999.

BIBLID.0025-8105:(2000):LIII:1-2:7-14.

Ethicon Endo-Surgery a Johnson & Johnson Company
April 16 - 20, 2000, University of Pisa - Italy

General Secretary:

Voice:++39-050-992423; Fax:++39-050-550593

Email: ec@dc.med.unipi.it

Registration Fee: 200 \$ (USA); 175 Euro; 360.000 Italian Lira