المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ٢، ٢٠٠٩ (٥٤٥-٥٤٩)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

إستخدام المستضد المستخلص بالاملاح من جراثيم *Brucella abortus* S99 في أختبار الاليزا غير المباشرللكشف عن داء البروسيلا في الانسان والابقار

نضال رؤوف مهدي* و وزيره يونس ابراهيم

فرع الاحياء المجهريه، كليه الطب البيطري، جامعة بغداد، بغداد، العراق
E-Mail: nidhal_raouf@yahoo.com*

الخلاصة

استخلصت المستضدات الخارجيه من *Brucella abortus* S99 بواسطه الاملاح واستخدمت كمستضد ماسك في أختبارالاليزا غيرالمباشر للكشف عن اضداد البروسيلا في مصول الانسان والابقار.اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لفصل المكونات البروتينيه في المستضد المستخلص بالاملاح (SEA) على اعمده من هلام متعدد الاكريل امايد بوجود الماده الماسخه (SDS-PAGE) بأحتوائه على خمس حزم بروتينيه تراوحت اوزانها الجزيئيه بين ٥٤,٠٠٠-١١٦,٠٠٠ دالتون. بينت نتائج فحص ٩٦ عينه مصليه لاشخاص مشكوك اصابتهم سريريا بداء البروسلات بان نسبه تواجد الاضداد بلغت ٩٤,٨٪ بأختبار الاليزا غير المباشر بينما كانت ٧٧,١٪ باختبار ورديه البنكال، اما نتائج فحص ١٠٤ عينه مصليه لابقار مشكوك اصابتها سريريا بداء البروسلات بلغت نسبه تواجد الاضداد ٩٦,٢٪ باختبار الاليزا غير المباشربينما كانت ٧٦,٩٪ باختبار ورديه البنكال. استنتج من هذه الدراسه ان اختبار الاليزا غير المباشر والمستخدم فيه المستضد المحضر كانت حساسيته ٩٥-٩٦٪ وخصوصيته ١٠٠٪ في معايره الاضداد النوعيه للبروسلا، وهذا يشير الى النوعيه العاليه للمحتوى البروتيني لمستضدSEA التي قد عززت من خصوصية الاختبار، بالاضافه الى التغلب على التفاعل التصالبي مع اضداد منتجه بسبب الاصابه بجراثيم أخرى معروف باعطائها تفاعل مناعي متصالب مع انواع البروسيلا.

Use of *Brucella abortus* S99 salt-extractable antigen in indirect ELISA for detection of human and bovine brucellosis

N. R. Mahdi and W. Y. Ibrahim

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Abstract

Salt-extractable antigen (SEA) of *B. abortus* S99 was used in indirect ELISA (i-ELISA) for detection of anti-*Brucella* antibodies in human and cattle sera. By using Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the SEA contained 5 bands of proteins with molecular weight of 54.000 -116.000 Dalton. Results indicated that the sero prevalence of 96 human sera that clinically suspected with brucellosis, the seroprevalence were 77.1% using rose-Bengal test (RBT) and 94.8% using i-ELISA. More over the result also showed that sero prevalence of 104 cattle sera that clinically suspected with brucellosis the seroprevalence were 79.9% using RBT and 96.2% using i-ELISA. This study concluded that the specificity of the i-ELISA with (SEA) antigen was 100% and the sensitivity was about 95-96%, this indicated to the specified proteins antigen that increased the specificity of the test, also overcome the problem associated with cross-reactivity of antibodies due to in infection with bacteria known to induce immunological cross-reactions with *Brucella* spp.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs
البحث جزء من رسالة الماجستير للباحث الثاني

المقدمة

داء البروسلا من الامراض الانتقاليه بين الحيوانات البريه والاليفه و كذلك تصيب الانسان (3,2,1)، ويعد من الامراض المهنيه حيث يصيب الاطباء البيطريين والعاملين في المجازر والمختبرات ومحطات تربيه الابقار، ومربي الحيوانات بسبب التعامل المباشر مع الحيوانات المصابه (4,2). التشخيص المختبري يعتمد على عزل الجرثومه من الدم واستخدام الفحوصات المصلية، فصعوبه تشخيص الحالات المزمنه (5) حيث العزل الجرثومي يعطي نتيجه سالبه (7,6) وان اختبار ورديه البنكال قد يعطي نتائج سالبه كاذبه في المراحل المبكره للمرض وكذلك بعد الاجهاض مباشره (8). أن النتائج السالبه والموجبه الكاذبه في الفحوصات السيرولوجيه وحصول تفاعل تصالبي مع بعض الجراثيم السالبه لصبغه كرام لذا يفضل استخدام اختبارات اخرى مثل الاليزا (9). أن اغلب المستضدات المستخدمه في فحص الاليزا هي مستضدات ذات محتوى عالي من متعدد السكريد الشحمي لجراثيم البروسلا والذي قد يعطي نتائج غير نوعيه ومربكه للتشخيص (10,11)، لذا هدفت هذه الدراسه استخلاص واستخدام مستضد (SEA) في اختبار الاليزا غير المباشر لفحص عينات مصول مشكوك اصابتها بداء البروسيلا للانسان والابقار ومعرفه حساسيه وخصوصيه الاختبار عند استعمال هذا المستضد.

المواد وطرق العمل

تحضير المستضد

العتره الضاريه لجراثيم *Brucella abortus* S99 حصل عليها من معهد المصول واللقاح / بغداد / وزاره الصحه والتي جهزت من قبل المختبرات المركزيه وايبرج-انكلترا. تم تنميه الجرثومة وتكثيرها حسب طريقه (12)، بعد التأكد من نقاوه الجرثومة حضر المستضد (SEA) اعتمادا على الطريقه المحوره من قبل (13) الطريقه تتلخص:الجرثومة المقتوله بالفورمالين غسلت مرتين بمحلول الملح الفسيولوجي البارد ٠,٨٥٪ واعيد تعليق الجرثومة بنفس تركيز الملح الفزيولوجي، مزجت مغناطيسيا مع كرات زجاجيه معقمه ذات حجم (١,٠ملم) بدرجه حراره ٤°م ولمده ١٨ ساعه، اجري الطرد المركزي بسرعه ٢٠,٠٠٠g في ٤°م ولمده ٣٠ دقيقه، بعدها اخذ الرائق ورشح تم قسم الى كميات صغيره وحفظ بدرجه حراره -٢٠°م. تم قياس المحتوى البروتيني للمستضد المحضر وحسب طريقه (14) حيث استخدمت عده فحص Modified total protein kitالمجهزه من قبل معهد المصول واللقاح / بغداد، ولمعرفه الاوزان الجزيئيه للبروتينات اجري الترحيل الكهربائى SDS-PAGE (15)، كذلك استخدمت الطريقه المتبعه من قبل (16) لتقدير نسبه الكاربوهيدرات.

نماذج المصول

شملت نماذج المصول المجاميع التاليه: المجموعه الاولى: ٩٦ عينه مصل من مرضى مشكوك اصابتهم سريريا بداء البروسلا. المجموعه الثانيه:٢٠عينه مصل من مرضى شخصت اصابتهم سريريا ومصليا (فحص ويدال) بالحمى التيفيه حيث استخدمت للتاكد من عدم حصول تفاعل تصالبي بين المستضد المحضر ومستضدات السالمونيلا التيفيه. المجموعه الثالثه:١٠٤عينه مصليه من ابقار مشكوك اصابتها سريريا بداء البروسلا، المصول حصل عليها من ابقار غير ملقحه بلقاحات البروسيلا لمنع حصول تداخل في مستوى الاضداد عند اجراء الفحوصات السيرولوجيه (17,18). مجموعه السيطره: ١٠ عينات مصليه من اشخاص سليمين سريريا ومصليا وغير مصابين بالبروسيلا سابقا و ١٠ عينات مصليه من ابقار سليمه سريرا ومصليا، غير مصابه بالبروسلا سابقا وغير ملقحه بلقاحات البروسيلا.

اختبار ورديه البنكال

استخدمت العده التشخيصيه المحضره من معهد المصول واللقاح / بغداد وتم اجراء الاختبارحسب الطريقه المتبعه من قبل.(12).

اختبار الاليزا غير المباشر

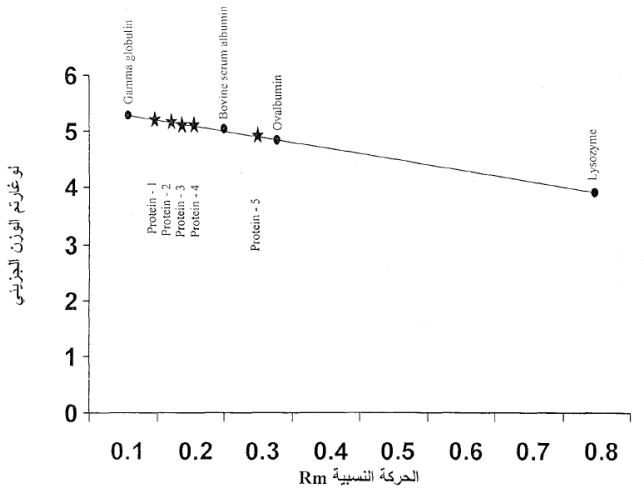
حيث استخدم المستضد (SEA) كمستضد ماسك لتغليف حفر اطباق المعايره الدقيقه، تمت معايره المستضد لتحديد التركيز الامثل وذلك مع مصول سالبه وموجبه قياسيه بالاضافه الى تراكيز مختلفه من المقترن الانزيمي واتبعت الطريقه المذكوره في OIE Manual (19) لاجراء الاختبار.للكشف عن اضداد البروسلا في عينات مصول الانسان استخدم المصل القياسي الموجب والسالب اضافه الى المقترن الانزيمي ومحاليل مجهزه من قبل شركه (VIRCE LL-GRANDA SPAIN) ولاحتساب النتائج اعتمدت الطريقه المتبعه والمذكوره في عده الاليزا المجهزه من الشركه المذكوره اعلاه.

وللكشف عن اضداد البروسلا في عينات مصول الابقار استخدم المصل القياسي الموجب والسالب اضافه الى المقترن الانزيمي ومحاليل حصل عليها من المشروع الوطني للسيطره على مرض الاجهاض الساري والسل والمجهزه من شركه (SYNBIOTIC EUROPE SAS)، واحتسبت النتائج اعتمادا على الطريقه المتبعه في عده الاليزا المجهزه من الشركه المذكوره اعلاه. لتحديد خصوصيه وحساسيه الاختبارات المصلية اعتمدت الطريقه المتبعه من قبل.Chapel et al (20).

النتائج

كانت نتائج المحتوى البروتيني للمستضد SEA بحدود ٤٠٠ مايكروغرام/مل بينما كان مقدار التلوث الكاربوهيدراتي بنسبه ٢,٩٪.

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للمستضد (SDS-PAGE) وقد أستخدمت طريقه (21) في استنتاج الوزن الجزيئي للبروتينات فوجود خمس حزم بروتينيه (الشكل ١) تراوحت اوزانها الجزيئيه مابين (٥٤,٠٠٠-١١٦,٠٠٠) دالتون (جدول ١).



الشكل (١) يوضح المنحنى القياسي للبروتينات القياسيه في SDS-PAGE لتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات المرحله لمستضد SEA لجر ثومة *B. abortus* العتره القياسيه S99.

جدول (١) يوضح الوزن الجزيئي لبروتينات المستضد المستخلص بالاملاح لجرثومه *B.abortus* للعتره القياسيه S99.

البروتينات	الوزن الجزيئي (دالتون)
١	١١٦,٠٠٠
٢	١٠٢,٠٠٠
٣	٩٧,٠٠٠
٤	٨٢,٠٠٠
٥	٥٤,٠٠٠

اظهرت نتائج اختبار ورديه البنكال ان النسبه الكليه لتواجد الاضداد في مصول المرضى المشكوك اصابتهم بداء البروسيلا هي ٧٧,١٪ بينما بلغت النسبه ٩٤,٨٪ باختبار الاليزا غير المباشر، اما في مصول الابقار المشكوك اصابتها بداء البروسلات فبلغت النسبه ٧٦,٩٪ باختبار ورديه البنكال و٩٦,٢٪ باختبار الاليزا غير المباشر. لم تسجل أي نتيجه موجبه في مصول مجموعه السيطره في أي من الفحصين المذكورين (جدول ٢).

من النتائج اعلاه يبين ان نسبه خصوصيه اختبار ورديه البنكال تراوحت بين (٧٦-٧٨٪) وحساسيته تراوحت بين (٨١-٨٣٪) اما اختبار الاليزا غير المباشر فكانت نسبه الخصوصيه ١٠٠٪ وتراوحت نسبه الحساسيه بين (٩٥-٩٦٪) (جدول ٣).

وللكشف عن امكانيه حصول تفاعل تصالبي بين المستضد SEA مع اضداد السالمونيلا التيفيه كانت النتائج سالبه لجميع عينات مصول مرضى الحمى التيفيه.

جدول (٢) مقارنه نسبه تواجد اضداد البروسيلا بأختبار ورديه البنكال مع اختبار الاليزا غير المباشر.

المجموعه	العدد الكلي	اختبار ورديه البنكال		اختبار الاليزا غير المباشر	
		% موجب	% سالب	% موجب	% سالب
مجموعه مصول مرضى مشكوك اصابتهم بداء البروسيلات	٩٦	٧٧,١	٢٢,٩	٩٤,٨	٥,٢
مجموعه مصول سيطره المرضى	١٠	٠	١٠٠	٠	١٠٠
مجموعه مصول الابقار المشكوك اصابتها بداء البروسيلات	١٠٤	٧٦,٩	٢٣,١	٩٦,٢	٣,٨
مجموعه مصول سيطره الابقار	١٠	٠	١٠٠	٠	١٠٠

جدول (٣) يوضح نسبة خصوصية وحساسية الفحوصات السيرولوجيه في تشخيص الاصابه بداء البروسيلات في الانسان و الابقار.

المجموع	الاختبار	% الخصوصيه	% الحساسيه
مجموعه مصول مرضى مشكوك اصابتهم بداء البروسيلات	اختبار ورديه البنكال	٧٨	٨١
	اختبار الاليزا غير المباشر	١٠٠	٩٥
مجموعه مصول الابقار المشكوك اصابتها بداء البروسيلات	اختبار ورديه البنكال	٧٦	٨٣
	اختبار الاليزا غير المباشر	١٠٠	٩٦

المناقشة

تضمنت هذه الدراسه استخدام مستضد SEAالمستخلص من *B. abortus* S99 في اختبار الاليزا غير المباشر للكشف عن الاضداد النوعيه للبروسيلا اضافه الى معرفه مدى حساسيه وخصوصيه الاختبار عند استخدام المستضد المحضر لحالات كانت مشكوك بأصابتها سريريا بداء البروسيلات، وخاصة المصول التي اعطت نتيجه سالبه بأختبار وردية البنكال، كذلك استبعاد التفاعل التصالبي نتيجه الاصابه بجراثيم تتشابه في تركيب متعدد السكريد الشحمي الموجود في جراثيم البروسيلا.

ان نتائج المحتوى البروتيني العاليه للمستضد SEAقد توافقت مع ما ذكره (22) بان ضمن البروتينات الخارجيه لجراثيم البروسيلا بروتينات ذات وزن جزيئي يقارب من١٠٠,٠٠٠ دالتون او اكثر، كما احتوى المستضد على نسبه قليليه جدا من الكاربوهيدرات (23).

اظهرت نتائج اختبار ورديه البنكال لمصول ألاشخاص المشكوك اصابتهم بداء البروسيلا نسبه ٢٢,٩٪ حاله سالبه بينما انخفضت النسبه الى ٥,٢٪ في اختبار الاليزا غير المباشر، اما نسبه النتائج السالبه في مصول الابقار المشكوك أصابتها بالبروسيلا فكانت ٢٣,١٪ في اختبار ورديه البنكال وانخفضت النسبه الى ٣,٨٪ في اختبار الاليزا غير المباشر، هذه النتائج تؤكد ان اختبار ورديه البنكال يعطي نتائج سالبه كاذبه قد يعود سبب ذلك الى عده عوامل منها نوع المستضد، حدوث ظاهره البروزون، صنف الجسم المضاد، المراحل المبكره من الاصابه (24,25) او بسبب تثبيط الاضداد المناعيه (Blocking antibodies) التي تظهر في المراحل المتاخره من المرض (26).

اوضحت الدراسات التي اجريت من قبل الباحثين (28,27) ان مستضدات SEA هي مكونات استضداديه منتجه للمناعه من خلال دراستهم للقابليه التمنيعيه، وفي دراستنا الحاليه امكن اعتمادها كوسيله تشخيصيه للكشف عن الاضداد النوعيه وهذا يتطابق مع نتائج الباحثين (29) عند استخدام البروتينات المستخلصه بالاملاح من جراثيم *B.melitensis*للكشف عن الاضداد النوعيه للبروسيلا في حليب الماعز المصابه، كذلك استخدم مستضد بروتينات الغشاء الخارجي للكشف عن اضداد داء البروسيلا في الانسان (30) على عكس مستضد متعدد السكريد الشحمي المستخدم بشكل سائد في اختبارات الاليزا غير المباشر (32,31) والذي قد يعطي تفاعل تصالبي لاضداد غير نوعيه بسبب التشابه بين متعدد السكريد الشحمي للبروسيلا مع مختلف الجراثيم ومنها *Escherichia coli*و *Yersinia enterocolitica*و *Pseudomonas solanacearum* و *Salmonella* group N (O:30) (34,33,19,10).من نتائج استخدام المستضد SEAمع عينات مصليه من مرضى الحمى التيفه حيث لم يحصل تفاعل تصالبي مع اضداد السالمونيلا التيفيه، هذا فقد اشار الباحث Corbel (35) الى نوعيه االمستضدات البروتينيه وامكانيه استخدامها في الاختبارات المصليه النوعيه لتشخيص داء البروسيلا حيث المحتوى البروتيني النوعي لمستضد SEA يزيد من خصوصيه اختبار الاليزا وحساسيته.

المصادر

1. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2006;6:91–99.
2. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. Lancet Infect Dis.2007 7(12):775-86.
3. Guerra H. The Brucellae and their success as pathogens. Crit Rev Microbiol. 2007;33(4):325-31.
4. Mantur BG, Amaranth SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian J Med Microbio. 2007;25(3):188-202.
5. McGiven JA, Stack JA, Perrett LL, Tucker JD, Brew SD, Subberfield E, MacMillan AP. Harmonisation of European tests for serological diagnosis of Brucella infection in bovines. Rev Sci Tech. 2006;25(3):1039-53.
6. Forsyth JRL, Alton GG. Brucella. In Medical microbiology, third edition. Eds, Samuel Baron, Churchill Livingstone, New York, 1991; pp. 397 -406.
7. Aliskan H. The value of culture and serological methods in the diagnosis of Human brucellosis. Microbiyol Bul. 2008;42(1):185-95.
8. Mandell, Douglas and Bennett`s.. Principales and practice of infection Diseases.6th ed, Churchull Livingston. 2005;pp.2669-72.
9. Gall D, Nielsen K. Serological diagnosis of bovine brucellosis:a review of test performance and cost comparison. Rev Sci Tech. 2004;23(3):989-1002.
10. Lamb V L, Jones G, Schurig A, Berman D. Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass- specific response to Brucella abortus lipopolysaccharides. Infect Immun. 1979;26:240–247.
11. Clavijo E, Diaz R, Anguita A, Garcia A P, Smits H L. Comparison of a dipstick assay for detection of Brucella-specific immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. Clin Diag Lab Immunol, 2003;10(4):612-615.
12. Alton G G, Jones L M, Angus R D, and Verger J M. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 1988.
13. Moreno-Lafont M C, Lo´pez-Merino A, Lo´pez-Santiago R. Cell Response to a Salt- Extractable and sonicated Brucella melitensis16M antigen in human brucellosis. Clin Diag Lab Immunol. 1995;2(3):377-380.
14. Wotton I D P. Micro-analysis in: Medical Biochemistry 4th ed. J and A. Churchill Ltd. London.1985.

extractable protein and lipopolysaccharide vaccines in BALB/C mice. Am J Vet Res. 1992;53:1900-1907.
28. Pugh GW, Tabatabai L B. Variation in Brucella abortus 2308 infection in BALB/C Mice induced by prior vaccination with Salt-extractable periplasmic proteins from Brucella abortus 19. 1996; 64:548-556.
29. Funk ND, Tabatabai LB, Elzer PH, Hagius SD., Martin BM, Hoffman LJ. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Brucella melitensis-Specific Antibodies in Goat Milk. J Clin Microbiol. 2005;43(2): 721–725.
30. Hunter SD, Bibb WF, Kantmaum AF, Mitchell JR, Mckinney RM. Enzyme immunosorbent assay with major outer membrane of Brucella melitensis to measure immune response to Brucella species. J Clin Microbiol. 1986;24:566- 572.
31. Nielsen K, Gall D. Advances in the diagnosis of bovine brucellosis: use of enzyme immunoassays. Gen Eng Biotechnol. 1994;14:25–39.
32. Lamb, VL, Jones G, Schurig D. Berman. Enzyme-linked Immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to Brucella abortus lipopolysaccharides. Infect Immun. 1979;26:240–247.
33. Munoz P M, Marin C M, Monreal D, Gonzalez D, Garin-Bastuji B, Diaz R, Mainar-Jaime R C, Moriyon I, Blasco J M. 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 Diag Lab Immunol. 2005;12(1): 141-151.
34. Nielsen K K, Stilwell B. Stemshorn R, Duncan. Ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)-labile bovine immunoglobulin M Fc binding to Brucella abortus:a cause of nonspecific agglutination. J Clin Microbiol. 1981;14:32–38.
35. Corbel MJ. Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological cross reactivity. Vet Bull.1985;55:927–942.
15. Garafin D E. Purification procedures: Electrophoretic method. In: Method enzymology.1990;182:425-441.
16. Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956;28:350–356.
17. Stevens MG, Hennager SG, Olsen SC, Cheville NF. Serologic responses in diagnostic test for brucellosis in cattle vaccinated with Brucella abortus 19 or RB15. J Clin Microbiol.1994;32:1065-1066.
18. Olsen SC, Jensen AE, Stoffrgen WC, Almer MV. Efficacy of calf hood vaccination with Brucella abortus strain RB51 in protecting bison against brucellosis. ResVet Sci. 2003;74(1):17-22.
19. OIE. Manual of Diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animal: Chapter 2.3.1:Bovine Brucellosis. 2008.
20. Chapel H. Haeney M, Misbah S, Snowden N. Essential of Clinical Immunology. 4th. ed. b. Blackwell Science.1999.
21. Segal IH. Biochemical calculation. 2nd.ed. Wiley, New York. 1985.
22. Marilyn RL, David HS. Human antibody response to individual outer membrane proteins of haemophiles influenza type b. Infect Immun.1982;37:1032-1036.
23. Verstreat DR, Creasy MT, Cavency NT, Baldwin CI, Balb MW,Winter AJ. Outer membrane protein of Brucella abortus: isolation and characterization. Infect Immun. 1982;35:974-989.
24. Radostits O M, Gay C C, Hinchcliff K W, Constable P O. Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses. 10th ed. Saunders Elsever. London. 2007;pp.971-972.
25. Garrido F, Duran M, Macmillan A, Minas A, Nicoletti P, Vecchi G. Brucellosis in sheep and goats (Br. melitensis). European Commission, Report of Scientific committee on animal health and animal welfare. 2001.
26. Thrusfield M. Veterinary epidemiology. Butterworths. London. 1986; pp.179-184.
27. Tabatabai LB, Pugh GW, Stevens MG, Philips M. Monophosphoryl lipid A-induced immune enhancement of Brucella abortus salt-