

إستخدام المستضد المستخلص بالاملاح من جراثيم *Brucella abortus* S99 في اختبار الاليزا غير المباشر للكشف عن داء البروسيلة في الانسان والابقار

نضال رؤوف مهدي* و وزيره يونس ابراهيم

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

الخلاصة

استخلصت المستضدات الخارجية من *Brucella abortus* S99 بواسطة الاملاح واستخدمت كمستضد ماسك في اختبار الاليزا غير المباشر للكشف عن اضرار البروسيلة في مصل الانسان والابقار. اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لفصل المكونات البروتينية في المستضد المستخلص بالاملاح (SEA) على اعمده من هلام متعدد الاكريل اميد بوجود المادة الماسخة (SDS-PAGE) بأحوائه على خمس حزم بروتينية تراوحت اوزانها الجزيئية بين 54.000-116.000 دالتون. بينت نتائج فحص 96 عينة مصلية لاشخاص مشكوك اصابتهم سريريا بداء البروسيلات بان نسبة تواجد الاضرار بلغت 94.8% باختبار الاليزا غير المباشر بينما كانت 77.1% باختبار ورديه البنكال، اما نتائج فحص 104 عينة مصلية لابقار مشكوك اصابتها سريريا بداء البروسيلات بلغت نسبة تواجد الاضرار 96.2% باختبار الاليزا غير المباشر بينما كانت 76.9% باختبار ورديه البنكال. استنتج من هذه الدراسة ان اختبار الاليزا غير المباشر والمستخدم فيه المستضد المحضر كانت حساسيته 95-96% وخصوصيته 100% في معايره الاضرار النوعية للبروسيلة، وهذا يشير الى النوعية العاليه للمحتوى البروتيني لمستضد SEA التي قد عززت من خصوصية الاختبار، بالاضافة الى التغلب على التفاعل التصالبي مع اضرار منتجة بسبب الاصابه بجراثيم أخرى معروف باعطائها تفاعل مناعي متصالب مع انواع البروسيلة.

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.

المقدمة

شملت نماذج المصول المجاميع التالية: المجموعه الاولى: 96 عينة مصل من مرضى مشكوك اصابتهم سريريا بداء البروسلا. المجموعه الثانيه: 20 عينة مصل من مرضى شخصت اصابتهم سريريا ومصليا (فحص ويدال) بالحمى التيفيه حيث استخدمت للتأكد من عدم حصول تفاعل تصالبي بين المستضد المحضر ومستضدات السالمونيلا التيفيه. المجموعه الثالثه: 104 عينة مصلية من ابقار مشكوك اصابته 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: 10 عينات مصلية من اشخاص سليمين سريريا ومصليا وغير مصابين بالبروسيلا سابقا و 10 عينات مصلية من ابقار سليمة سريريا ومصليا، غير مصابه بالبروسيلا سابقا وغير ملقحه بلقاحات البروسيلا.

اختبار وريده البنكال

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

اختبار الاليزا غير المباشر

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

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

النتائج

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 تربيته 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 نتيجته ساليه (7,6) وان اختبار وريده البنكال قد يعطي نتائج ساليه كاذبه في المراحل المبكره للمرض وكذلك بعد الاجهاض مباشره (8). أن النتائج الساليه والموجه الكاذبه في الفحوصات السيرولوجيه وحصول تفاعل تصالبي مع بعض الجراثيم الساليه لصيغه 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 مصل مشكوك اصابته 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 وايجر-انكلترا. تم تنميه الجرثومه وتكثيرها حسب طريقه (12)، بعد التأكد من نقاوه الجرثومه حضر المستضد (SEA) اعتمادا على الطريقه المحوره من قبل (13) الطريقه تتلخص: الجرثومه المقتوله بالفورمالين غسلت مرتين بمحلول الملح الفسيولوجي البارد 0.85% واعيد تعليق الجرثومه بنفس تركيز الملح الفزيولوجي، مزجت مغناطيسيا مع كرات زجاجيه معقمه ذات حجم (0.1 مل) بدرجه حراره 4°م ولمده 18 ساعه، اجري الطرد المركزي بسرعه 20.000g في 4°م ولمده 30 دقيقه، بعدها اخذ الرائق ورشح تم قسم الى كميات صغيره وحفظ بدرجه حراره -20°م. تم قياس المحتوى البروتيني للمستضد المحضر وحسب طريقه (14) حيث استخدمت عده فحص Modified total protein kit المجهره من قبل معهد المصول واللقاح / بغداد، ولمعرفه الاوزان الجزيئيه للبروتينات اجري الترحيل الكهربائي SDS-PAGE (15)، كذلك استخدمت الطريقه المتبعه من قبل (16) لتقدير نسبه الكاربوهيدرات.

نماذج المصول

جدول (1) يوضح الوزن الجزيئي لبروتينات المستضد المستخلص بالاملاح لجرثومه *B.abortus* للعترة القياسية S99.

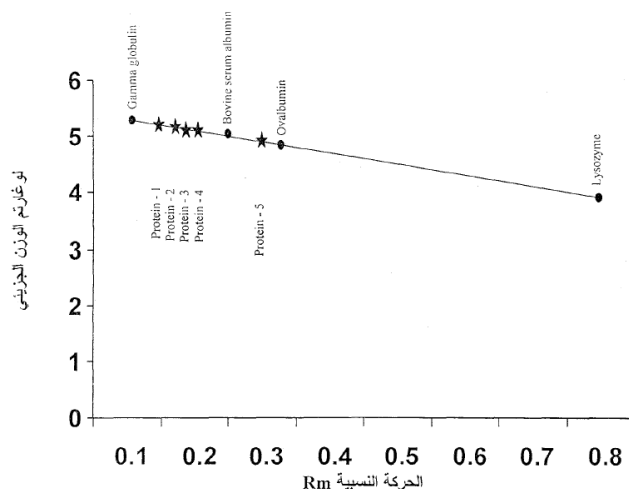
البروتينات	الوزن الجزيئي (دالتون)
1	116.000
2	102.000
3	97.000
4	82.000
5	54.000

اظهرت نتائج اختبار ورديه البنكال ان النسبه الكليه لتواجد الاضداد في مصل المرضي المشكوك اصابتهم بداء البروسيلا هي 77.1% بينما بلغت النسبه 94.8% باختبار الاليزا غير المباشر، اما في مصل الابقار المشكوك اصابتهم بداء البروسلات فبلغت النسبه 76.9% باختبار ورديه البنكال و96.2% باختبار الاليزا غير المباشر. لم تسجل أي نتيجة موجبه في مصل مجموعه السيطره في أي من الفحصين المذكورين (جدول 2).

من النتائج اعلاه يبين ان نسبه خصوصيه اختبار ورديه البنكال تراوحت بين (76-78%) وحساسيته تراوحت بين (81-83%) اما اختبار الاليزا غير المباشر فكانت نسبه الخصوصيه 100% وتراوحت نسبه الحساسيه بين (95-96%) (جدول 3). وللكشف عن امكانيه حصول تفاعل تصالبي بين المستضد SEA مع اعداد السالمونيلا التيفيه كانت النتائج سالبه لجميع عينات مصل مرضي الحمى التيفيه.

كانت نتائج المحتوى البروتيني للمستضد SEA بحدود 400 مايكروغرام/مل بينما كان مقدار التلوث الكاربوهيدراتي بنسبه 2.9%.

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للمستضد (SDS-PAGE) وقد استخدمت طريقه (21) في استنتاج الوزن الجزيئي للبروتينات فوجد خمس حزم بروتينية (الشكل 1) تراوحت اوزانها الجزيئيه ما بين (116.000-54.000) دالتون (جدول 1).



الشكل (1) يوضح المنحنى القياسي للبروتينات القياسية في SDS-PAGE لتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات المرحله لمستضد SEA لجرثومه *B. abortus* العترة القياسية S99.

جدول (2) مقارنة نسبه تواجد اعداد البروسيلا باختبار ورديه البنكال مع اختبار الاليزا غير المباشر.

المجموعه	العدد الكلي	اختبار ورديه البنكال		اختبار الاليزا غير المباشر	
		% سالب	% موجب	% سالب	% موجب
مجموعه مصل مرضي مشكوك اصابتهم بداء البروسيلا	96	22.9	77.1	5.2	94.8
مجموعه مصل سيطره المرضي	10	100	0	100	0
مجموعه مصل الابقار المشكوك اصابتهم بداء البروسيلا	104	23.1	76.9	3.8	96.2
مجموعه مصل سيطره الابقار	10	100	0	100	0

جدول (3) يوضح نسبة خصوصية وحساسية الفحوصات السيرولوجيه في تشخيص الاصابه بداء البروسيلا في الانسان و الابقار.

المجموع	الاختبار	% الخصوصيه	% الحساسيه
مجموعه مصول مرضى مشكوك اصابتهم بداء البروسيلات	اختبار وريدي البنكال	78	81
	اختبار الاليزا غير المباشر	100	95
مجموعه مصول الابقار المشكوك اصابتهم بداء البروسيلات	اختبار وريدي البنكال	76	83
	اختبار الاليزا غير المباشر	100	96

المناقشة

مختلف الجراثيم ومنها *Escherichia coli* و *Yersinia* *Salmonella* و *Pseudomonas solanacearum* و *enterocolitica* group N (O:30). من نتائج استخدام المستضد SEA مع عينات مصليه من مرضى الحمى التيفيه حيث لم يحصل تفاعل تصالي مع اعداد السالمونيلا التيفيه، هذا فقد اشار الباحث Corbel (35) الى نوعيه المستضدات البروتينيه وامكانيه استخدامها في الاختبارات المصليه النوعيه لتشخيص داء البروسيلات حيث المحتوى البروتيني النوعي لمستضد SEA يزيد من خصوصيه اختبار الاليزا وحساسيته.

المصادر

- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:91-99.
- Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2007 7(12):775-86.
- Guerra H. The Brucellae and their success as pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 2007;33(4):325-31.
- Mantur BG, Amaranth SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J Med Microbio.* 2007;25(3):188-202.
- 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.
- Forsyth JRL, Alton GG. Brucella. In *Medical microbiology*, third edition. Eds, Samuel Baron, Churchill Livingstone, New York, 1991; pp. 397-406.
- Aliskan H. The value of culture and serological methods in the diagnosis of Human brucellosis. *Microbiol Bul.* 2008;42(1):185-95.
- Mandell, Douglas and Bennett's. *Principales and practice of infection Diseases*. 6th ed, Churchill Livingstone. 2005;pp.2669-72.
- 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.
- 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.
- 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.
- Alton G G, Jones L M, Angus R D, and Verger J M. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 1988.
- Moreno-Lafont M C, Lo'pez-Merino A, Lo'pez-Santiago R. Cell Response to a Salt- Extractable and sonicated Brucella melitensis 16M antigen in human brucellosis. *Clin Diag Lab Immunol.* 1995;2(3):377-380.
- Wotton I D P. *Micro-analysis in: Medical Biochemistry* 4th ed. J and A. Churchill Ltd. London. 1985.

تضمنت هذه الدراسة استخدام مستضد SEA المستخلص من *B. abortus* S99 في اختبار الاليزا غير المباشر للكشف عن الاضداد النوعيه للبروسيلات اضافته الى معرفه مدى حساسيه وخصوصيه الاختبار عند استخدام المستضد المحضر لحالات كانت مشكوك بأصابتها سريريا بداء البروسيلات، وخاصة المصول التي اعطت نتيجة سالبه بأختبار وريدي البنكال، كذلك استبعاد التفاعل التصالي نتيجة الاصابه بجراثيم تتشابه في تركيب متعدد السكريد الشحمي الموجود في جراثيم البروسيلات. ان نتائج المحتوى البروتيني العاليه للمستضد SEA قد توافقت مع ما ذكره (22) بان ضمن البروتينات الخارجيه لجراثيم البروسيلات بروتينات ذات وزن جزيئي يقارب من 100.000 دالتون او اكثر، كما احتوى المستضد على نسبة قليله جدا من الكاربوهيدرات (23).

اظهرت نتائج اختبار وريدي البنكال لمصول الاشخاص المشكوك اصابتهم بداء البروسيلات نسبة 22.9% حاله سالبه بينما انخفضت النسبه الى 5.2% في اختبار الاليزا غير المباشر، اما نسبة النتائج السالبه في مصول الابقار المشكوك اصابتهم بالبروسيلات فكانت 23.1% في اختبار وريدي البنكال وانخفضت النسبه الى 3.8% في اختبار الاليزا غير المباشر، هذه النتائج تؤكد ان اختبار وريدي 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 المتأخره من المرض (26). اوضحت الدراسات التي اجريت من قبل الباحثين (27,28) ان مستضدات SEA هي مكونات استضاديه 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 المستخلصة بالاملاح من جراثيم *B. melitensis* للكشف عن الاضداد النوعيه للبروسيلات في حليب الماعز المصابه، كذلك استخدم مستضد بروتينات الغشاء الخارجي للكشف عن اضداد داء البروسيلات في الانسان (30) على عكس مستضد متعدد السكريد الشحمي المستخدم بشكل سائد في اختبارات الاليزا غير المباشر (31,32) والذي قد يعطي تفاعل تصالي لاضداد غير نوعيه بسبب التشابه بين متعدد السكريد الشحمي للبروسيلات مع

- 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. Verstreut 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-