

إستخدام المستضد المستخلص بالاملاح من جراثيم *Brucella abortus* S99 في أختبار الاليزا غير المباشر للكشف عن داء البروسيليا 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 الخارجيه من *Brucella abortus* S99 بواسطة الاملاح واستخدمت كمستضد ماسك في أختبار الاليزا غير المباشر للكشف عن اضرار البروسيليا في مصول الانسان والابقار. اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لفصل المكونات البروتينيه في المستضد المستخلص بالاملاح (SEA) على اعده من هلام متعدد الاكريل امايد بوجود ماده 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 البروسيلات بان نسبه تواجد الاضرار بلغت ٩٤,٨% بأختبار الاليزا غير المباشر بينما كانت ٧٧,١% باختبار وريدي البنكال، اما نتائج فحص ١٠٤ عينه مصليه لابقار مشكوك اصابتها سريريا بداء البروسيلات بلغت نسبه تواجد الاضرار ٩٦,٢% بأختبار الاليزا غير المباشر بينما كانت ٧٦,٩% بأختبار وريدي البنكال. استنتج من هذه الدراسه ان اختبار الاليزا غير المباشر والمستخدم فيه المستضد المحضر كانت حساسيته ٩٥-٩٦% وخصوصيته ١٠٠% في معايره الاضرار النوعيه للبروسلا، وهذا يشير الى النوعيه العاليه للمحتوى البروتيني لمستضد SEA التي قد عززت من خصوصية الاختبار، بالاضافه الى التغلب على التفاعل التصالبي مع اضرار منتج بسبب الاصابه بجراثيم أخرى معروف باعطائها تفاعل مناعي متصالب مع انواع البروسيليا.

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.

نماذج المصول

شملت نماذج المصول المجاميع التالية: المجموعة الأولى: ٩٦ عينة مصل من مرضى مشكوك أصابتهم سريريا بداء البروسلا. المجموعة الثانية: ٢٠ عينة مصل من مرضى شخضت أصابتهم سريريا ومصليا (فحص ويدال) بالحمى التيفية حيث استخدمت للتأكد من عدم حصول تفاعل تصالبي بين المستضد المحضر ومستضدات السالمونيلا التيفية. المجموعة الثالثة: ١٠٤ عينة مصليه من ابقار مشكوك أصابتها سريريا بداء البروسلا، المصول حصل عليها من ابقار غير ملقحة بلقاحات البروسلا لمنع حصول تداخل في مستوى الاضداد عند اجراء الفحوصات السيرولوجيه (17,18). مجموعة السيطره: ١٠ عينات مصليه من اشخاص سليمين سريريا ومصليا وغير مصابين بالبروسلا سابقا و ١٠ عينات مصليه من ابقار سليمة سريرا ومصليا، غير مصابه بالبروسلا سابقا وغير ملقحة بلقاحات البروسلا.

اختبار ورديه 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 المعاييره الدقيقه، تمت معاييره المستضد لتحديد التركيز الامثل وذلك مع مصول سالبه وموجبه قياسي به بالاضافه الى تراكيز مختلفه من المقترن الانزيمي واتبعت الطريقه المذكوره في OIE Manual (19) لاجراء الاختبار. للكشف عن اعداد البروسلا في عينات مصول الانسان استخدم المصل القياسي الموجب والسالب اضافه الى المقترن الانزيمي ومحاليل مجهزه من قبل شركه (VIRCE LL-GRANDA SPAIN) ولاحتماب النتائج اعتمدت الطريقه المتبعه والمذكوره في عده الاليزا المجهزه من الشركه المذكوره اعلاه.

وللكشف عن اعداد 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).

داء البروسلا من الامراض الانتقاليه بين الحيوانات البريه والايفه و كذلك تصيب الانسان (3,2,1)، ويعد من الامراض المهنيه حيث يصيب اطباء 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 نتيجته 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 أصابتها بداء البروسلا للانسان والابقار ومعرفه حساسيه وخصوصيه الاختبار عند استعمال هذا المستضد.

المواد وطرق العمل

تحضير المستضد

العتره الضاربه لجراثيم *Brucella abortus* S99 حصل عليها من معهد المصول واللقاح / بغداد / وزاره الصحه والتي جهزت من قبل المختبرات المركزيه وايرج-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 ٨٥%، واعد تعليق الجرثومه 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 kit المجهزه 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.

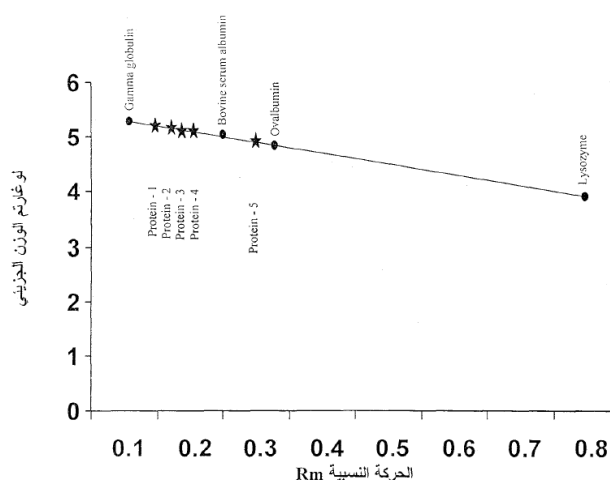
النتائج

جدول (١) يوضح الوزن الجزيئي لبروتينات المستضد المستخلص بالأملاح لجرثومه *B.abortus* للعترة القياسية S99.

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

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

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للمستضد (SDS-PAGE) وقد أستخدمت طريقه (21) في استنتاج الوزن الجزيئي للبروتينات فوجد خمس حزم بروتينية (الشكل ١) تراوحت أوزانها الجزيئية ما بين (١١٦,٠٠٠-٥٤,٠٠٠) دالتون (جدول ١).



أظهرت نتائج اختبار وريده البنكال ان النسبه الكليه لتواجد الاضداد في مصول المرضى المشكوك اصابتهم بداء البروسيليا هي ٧٧,١% بينما بلغت النسبه ٩٤,٨% باختبار الاليزا غير المباشر، اما في مصول الايقار المشكوك اصابتها بداء البروسيلات فبلغت النسبه ٧٦,٩% باختبار وريده البنكال و٩٦,٢% باختبار الاليزا غير المباشر. لم تسجل أي نتيجة موجبه في مصول مجموعه السيطره في أي من الفحصين المذكورين (جدول ٢).

من النتائج اعلاه يبين ان نسبه خصوصيه اختبار وريده 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.

الشكل (١) يوضح المنحنى القياسي للبروتينات القياسية في SDS-PAGE لتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات المرحله لمستضد SEA لجرثومه *B. abortus* العترة القياسية S99.

جدول (٢) مقارنة نسبه تواجده اضداد البروسيليا بأختبار وريده البنكال مع اختبار الاليزا غير المباشر.

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

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

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

المناقشة

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 تصالبي لاضداد غير نوعيه بسبب التشابه بين متعدد السكريد الشحمي للبروسيلات مع مختلف الجراثيم ومنها *Escherichia coli* و *Yersinia enterocolitica* و *Pseudomonas solanacearum* و *Salmonella* group N (O:30) (10,19,33,34). من نتائج استخدام المستضد SEA مع عينات مصليه من مرضى الحمى التيفيه حيث لم يحصل تفاعل تصالبي مع اعداد السالمونيلا التيفيه، هذا فقد اشار الباحث Corbel (35) الى نوعيه المستضدات البروتينيه وامكانيه استخدامها في الاختبارات المصلية 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

تضمنت هذه الدراسة استخدام مستضد SEA المستخلص من *B. abortus* S99 في اختبار الاليزا غير المباشر للكشف عن الاضداد النوعيه للبروسيلات اضافة الى معرفه مدى حساسيه وخصوصيه الاختبار عند استخدام المستضد المحضر لحالات كانت مشكوك باصابتها سريريا بداء البروسيلات، وخاصة المصول التي اعطت نتيجة سالبه بأختبار وريديه البنكالك، كذلك استبعاد التفاعل التصالبي نتيجة الاصابة 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 ١٠٠,٠٠٠ دالتون او اكثر، كما احتوى المستضد على نسبة قليليه جدا من الكربوهيدرات (23).

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

اوضحت الدراسات التي اجريت من قبل الباحثين (27,28) ان مستضدات SEA هي مكونات استضاديه منتهجه 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 اعداد

- 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-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.
- 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 melitensis* 16M 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.
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, Stoffirgen 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*