مقارنة كفاءة الفحوص المصلية لتشخيص داء البروسيلا

عدنان هادي جواد* كفاح احمد جاسم* كريمة حسون حمادي* زياد حافظ عبود*

تاريخ قبول النشر 26 /5 /2009

الخلاصة :

استخدمت مقارنة كفاءة خمس طرائق مصلية للكشف عن البروسيلا ، أربعاً منها تعد من الطرائق الشائعة المستخدمة في هذا المجال هي:-

أ. روزبنكال:- كفحص مسحي أولي الذي يعتمد على التحري عن الأجسام المضادة في مصل الدم.
ب. فحص التألق المناعي غير المباشر (IFAT) :- الذي يحدد الأجسام المضادة نوع IgG و IgM في المصل.
ج. فحص الميركابتوايثانول 2 (2ME) المحدد للأجسام المضادة نوع IgG
د. فحص الأليزا غير المباشر (ELISA) المحدد للأجسام المضادة نوع IgG .
و. أما الطريقة الخامسة فهي جديدة ولم يسبق استخدامها (ولا سيما في القطر) إذ تم تطويرها في أحد المراكز الصحية في بغداد ، والتي تعرف بالاختبار المناعي البقعي (المبقع) (SIA) Spot Immune Assay والتي تعتمد على تحديد الأجسام المضادة نوع IgG .

أظهرت نتائج فحوص (100) عينة دم مريض مشمول بالدراسة كانت (76)، (49)، (49)، (37)، (28) منها أعطت نتائج موجبة لكل من فحوصات Rose bengal, ELISA ، SIA ، 2ME ، IFAT على التوالي.

ولدى مقارنة كفاءة وحساسية وخصوصية الطرائق هذه فقد أوضحت النتائج:-

أ. تفوق طريقتي الـ ELISA و SIA على الطرائق التأكيدية الأخرى من حيث الكفاءة في التشخيص ، إذ شخصت أعلى عدد من الحالات (46) من مجموع (76) حالة موجبة لروزبنكال .
ب. لم يكن فحص الـ 2ME كفوءاً في التحسس إلى التراكيز القليلة للأجسام المضادة نوع IgG ، إذ لم يتم الكشف سوى عن أقل من نصف عدد الحالات للروزبنكال.
ج. انخفاض كفاءة فحص (IFAT) إذ لم يتم الكشف من خلاله إلا لثلث عدد الحالات الموجبة بفحص روزبنكال تقريباً.
د. أظهرت النتائج أهمية فحص الـ SIA كفحص جديد مقارنة مع الفحوصات المصلية الأخرى لما يمتاز به من حساسية وخصوصية لا تقل عن فحص الـ (ELISA) ، فضلاً عن سهولة أجرائه وعدم حاجته إلى أجهزة مكلفة ومعقدة.

الكلمات المفتاحية:-الاجسام المضادة IgG، الاجسام المضادة IgM ،داء البروسيلا،الاختبار المناعي البقعي .

المقدمة:

يعد داء البروسيلا (Brucellosis) من الأمراض الخطيرة التي تصيب الإنسان والحيوان، حيث ينتشر في أجزاء عديدة من العالم ولا سيما أقطار البحر الأبيض المتوسط، ويحظى داء البروسيلا باهتمام الباحثين والعاملين في المجال الطبي لكونه يمثل إحدى مشاكل الصحة العامة الرئيسة سواء في المناطق المدنية أو الريفية ولا سيما في بلدان العالم الثالث [1].

يعد داء البروسيلا من الأمراض النموذجية المشتركة بين الإنسان والحيوان ، إذ يعتمد نقل المرض على تناول الأطعمة الملوثة ببكتريا البروسيلا والملامسة المباشرة لإفرازات الحيوانات المصابة والمجهضة أو نتيجة لتناول منتجات الألبان غير المبسترة ، وقد ينتقل المرض عن طريق الاستنشاق أو أثناء التلقيح ، أما انتقال الإصابة من شخص إلى أخر فهي حالات نادرة الحدث جداً [2].

تعود العوامل المسببة لداء البروسيلات إلى بعض أنواع جنس البروسيلا وهي البروسيلا المالطية (*Brucella melitensis*) ، البروسيلا المجهضة (*Br. abortus*) ، وبروسيلا الخنازير (*Br. suis*) ، بروسيلا الكلاب (*Br. canis*) ، وبروسيلا الأغنام (*Br. ovis*) ، بروسيلا القوارض (*Br. neotomae*) والبروسيلا البحرية (*Br. maris*) [3]. بينت المراجع العلمية المحلية أن البروسيلا المجهضة اكثر انتشاراً من البروسيلا المالطية في الحليب والجبن الطري ، وإن إصابة الإنسان بالبروسيلا المجهضة هي من اكثر الأنواع الأخرى [4]. استخدمت العديد من المضادات الحيوية لعلاج داء البروسيلات كان أفضلها ذلك

* وزارة الصحة / مختبر الصحة العامة المركزي

المتكون من Rifampicin, Ciprofloxacin [5].

ونظراً لأهمية المرض عالمياً وضرورة السرعة والدقة في تشخيصه لأخذ العلاج اللازم قام الباحثون باستخدام عدة طرائق في التشخيص كزرع الدم ، سائل النخاع الشوكي، وسوائل الجسم الأخرى، وكذلك الطرق المصلية التي تعتمد على تحديد الأجسام المضادة في مصل المريض، ولا يتم الاعتماد على نتائج طريقة زرع الدم في الكثير من المستشفيات لأنها تتطلب وقتاً طويلاً قد يصل إلى (30) يوماً مقارنة مع الفحوصات المصلية السريعة، فضلاً عن صعوبة تحديد الوقت الذي يجب عنده اخذ العينة، فضلاً عن إمكانية إعطائه نتيجة سالبة خاطئة إذ ما كان المريض قد تناول المضادات الحيوية [6] ، لذلك فقد تم اللجوء إلى استعمال فحص روزبنكال السريع والمعتمد أيضاً بشكل واسع في مختبرات القطر ، ولكنه قد يعطي نتائج غير دقيقة أيضاً من خلال ظهور تلازن مع الأجسام المضادة نوع IgM لمصول الأشخاص الأصحاء ممن هم بتماس مع الحيوانات أو من الذين سبق وأن أصيبوا بالمرض [7] ، إذ أن الصفات الرئيسة للأجسام المضادة نوع IgM بقاءها في الجسم لأشهر عديدة أو سنتين أحياناً[1] .

وفي العراق تشير التقارير الصحية إلى زيادة أعداد المصابين بداء البروسيلا خلال السنوات العشر الماضية بسبب الحصار الاقتصادي وانعكاس أثاره على نقص الخدمات الطبية المقدمة للمرضى وشحة الدواء.

جاءت هذه الدراسة لتهدف الى:

1. تقييم أهمية الفحوصات المصلية المستخدمة في تشخيص داء البروسلا.
2. تقييم إحدى طرائق التشخيص المصلي الجديدة (عدة تشخيصية) لتشخيص داء البروسيلا في الإنسان كاضافة للفحوص المصلية المستخدمة لتشخيص داء البروسلات.

3- مقارنة كفاءة طرائق التشخيص المصلي في الكشف السريع والدقيق عن داء البروسيلا وذلك من خلال قدرة الطريقة عن الكشف عن اقل تركيز للاجسام المضادة في مصول المرضى.

المواد وطرائق العمل

تم جمع (100) نموذج دم لمرضى مشكوك باصابتهم بداء البروسيلا، أحيلوا إلى مختبر الصحة العامة المركزي في بغداد ، و(10) نماذج لاشخاص اصحاء من الذين لم تظهر عليهم الأعراض المرضية من خلال إعطائهم لنتيجة سالبة لفحص الروزبنكال ، للفترة من نيسان عام (2007) لغاية نيسان عام (2008)

ثم فصلت نماذج المصل بجهاز الطرد المركزي للحصول على مصول المرضى . والذي استخدمت لاختبار تلازن الأضداد مع عالق البروسيلا الملون (المستضدات) والميركابتوايثانول 2 (2-Mercaptoethanol ME) وحفظ المصل المتبقي بدرجة (20-)م لحين استعماله. اما عينات دم الأشخاص من الأصحاء فقد استخدمت كمعاملات سيطرة .

اختبار روزبنكال Rose bengal test

استعمل عالق البروسيلا الملون (المستضدات) والمجهزة من شركة Biomerieux الفرنسية للكشف عن الأجسام المضادة لبكتريا البروسيلا في مصول المرضى ، اجري الاختبار بوضع قطرة واحدة (30 مايكروليتر) من المصل على الشريحة زجاجية ثم أضيفت قطرة واحدة من المستضد (30مايكرولتير) ايضا ، مزجت بعدها القطرتان وبواسطة قصبة بلاستيكية لمدة دقيقتين . ثم قراءت النتيجة مباشرة ، إذ يتميز التفاعل الموجب بحدوث تلازن يظهر بشكل حبيبات وردية مترسبة بوصفها دليلاً على وجود الأجسام المضادة الخاصة بالبروسيلا ، والتفاعل سالب بعدم ظهور التلازن .

اختبار الميركابتوايثانول -2) Mercaptoethanol test)

بعد ان خفف محلول الميركابتوايثانول المركز (حسب تعليمات الشركة المجهزة حضراً آنياً). سحب حوالي (50) مايكروليتر في أنبوبة اختبار صغيرة أضيف إليها (50) مايكروليتر من مصل المريض ، حضن بدرجة (37) م لمدة نصف ساعة ، وبعد الحضن سحب (30) مايكروليتر ووضع على شريحة زجاجية نظيفة ثم أضيف إليه مستضد عالق الروزينكال الوردي (30مايكرولتير) ومزجت القطرتان بواسطة قصبة بلاستيكية ،ثم قرأت النتيجة مباشرة كما ذكر سابقا كدليل على وجود أجسام مضادة ضد بكتريا البروسيلا نوع IgG ، فيما يستدل على التفاعل السالب بعدم ظهور تلازن.

اختبار التالق المناعي غير المباشر Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)

اجري هذا الاختبار حسب ما جاء في [8]

أ- تم تطبيع عالق مستضد خلايا البروسيلا المجهضة المجفدة (بعدان أضيف إليها 1 مل من الماء المقطر) وذلك بسحب (10) مايكروليتر من هذا العالق ووضعه على الشرائح الخاصة باختبار IFAT ، وحضنت الشرائح بدرجة (37) م لمدة (18) ساعة

حتى تجف ، وفي اليوم الثاني تم تثبيت الخلايا على لهب مصباح لمدة (2-3) دقائق .
ب- أضيف (10) مايكروليتر من مصل المريض إلى المستضد في الحفر وترك في حمام مائي بدرجة (37) مo لفترة نصف ساعة .
ج- غلست الشرائح بداري الفوسفيت الملحي لفترة (10) دقائق ثم بالماء المقطر لمدة (5) دقائق أخرى ، جففت بعدها الشرائح .
د- أضيف (10) مايكروليتر من المقترن المناعي FLUOLINE H المرتبط بالصبغة الضيئه المخفف بمقدار (1/32) بواسطة داري الفوسفيت الملحي وصبغه Evans blue (حضر انياً حسب تعليمات الشركة المجهزة) .
هـ – كررت الخطوة (ج) مرة ثانية .
و- أضيف داري الكلسيرين بمقدار قطرة واحدة لكل حفرة من حفر الشرائح ، (حضر داري الكلسيرين باضافة 9حجم من الكلسيرين إلى حجم واحد من محلول داري الفوسفيت الملحي).
ز- تم الفحص بمجهر التألق المناعي تحت العدسة 100 X ولوحظت النتيجة الموجبة بظهور خلايا عصوية قصيرة ذات لون اخضر مصفر.

اختبار الاليزا غير المباشر

Indirect Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA)

معايرة التراكيز المستعملة في فحص الاليزا

تمت معايرة تراكيز تخافيف مصول السيطرة الموجبة والسالبة وتركيز مستضد عديد السكرايد الشحمي (LPS) ، وتراكيز المقترن الأنزيمي الـ IgG بعملية المعايرة ، وتم التوصيل إلى اعتبار التخفيف (1/100) بالنسبة للمصول هو التخفيف الامثل ، تركيز (10) مايكروغرام / مل كامثل تركيز بالنسبة للمستضد (LPS) الخام ، اما بالنسبة للمقترن المناعي الأنزيمي Anti IgG فوجد ان تركيز (50:1) وحسب توصية الشركة المجهزة بالنشرة الداخلية هو التركيز الامثل .
خفف المستضد (LPS) الخام ، باستعمال داري الكاربونات – بيكاربونات المعروف بداري التغليف (Coating buffer). للوصول إلى تركيز (10) مايكروغرام / مل ، إذ استعمل (100) مايكروليتر من هذا التركيز لتغطية الحفر الموجودة بأطباق الاليزا الخاصة ، ثم وضع الطبق بدرجة (4) مo لمدة (18) ساعة ، بعدها غسل الطبق اربع مرات بجهاز الغسل وباستخدام داري الغسل.
أ- أضيف (100) مايكروليتر من مصل كل مريض إلى الحفر الموجودة بالطبق بعد ان خفف إلى 1/100 بواسطة محلول تخفيف العينة، ثم وضع الطبق على جهاز هزازة لمدة ساعة ، غسل بعدها لاربع مرات بجهاز الغسل باستخدام داري الغسل .
ج- أضيف (100) مايكروليتر من المقترن المناعي الأنزيمي IgG (بعد ان خفف بمحلول تخفيف المقترن) إلى كل حفرة ثم وضع الطبق على جهاز هزازة لمدة ساعة ، غسل بعدها بجهاز الغسل باستخدام داري الغسل لاربع مرات (فوسفيت بفر + Tween-20) .
د- أضيف (100) مايكروليتر من المادة الأساس (بعد ان خففت باستخدام محلول تخفيف المادة الأساس) إلى كل حفرة ثم ترك الطبق مدة نصف ساعة على الجهاز الهزاز ، بعدها تم إيقاف التفاعل بإضافة (100) مايكروليتر من محلول ايقاف التفاعل وهو حامض الكبريتيك (1N) إلى كل حفرة .
هـ – تمت قراءة قيم الامتصاص الضوئي باستخدام جهاز القراءة الخاص بفحص الاليزا وبطول موجي 450 نانومتر .
ملاحظة : استعلمت مصول السيطرة الموجبة والسالبة في كل طبق تم فحصه وذلك لاستخراج حدود قراءة النتائج الموجبة الضعيفة Cut off وكما جاء في [9].

CUT OFF = (قراءة السيطرة الموجبة + قراءة السيطرة السالبة) / 2

الاختبار المناعي البقعي (المبقع) – SIA Brucella IgG

(Spot Immune assay Brucella IgG)

أ- استخدم الملقط لوضع الأشرطة الخاصة بالفحص وبصورة جيدة في أحواض صغيرة، إضافة إلى أشرطة السيطرة (سالبة والموجبة والموجبة الضعيفة).
ب- أضيف (990) مايكروليتر من محلول تخفيف النموذج / المقترن بكل حوض .
ج- أضيف (10) مايكروليتر من مصل كل مريض في الحوض الخاص به .
د- أضيف إلى حوض السيطرة السالبة(1) مل من محلول السيطرة السالبة (والمجهز مع العدة) و(1) مل من محلول السيطرة الموجبة (المجهزة مع العدة) إلى حوض السيطرة الموجبة والموجبة الضعيفة .
هـ- غطيت الأحواض بغطاء ثم وضعت على جهاز الهزاز لمدة ساعة .
و- بعدها تم سحب المحلول الموجود في كل حوض وغسل الشريط لثلاث مرات بواسطة (2) مل من محلول داري الغسل ، في كل مرة ، ثم ينشف الحوض من محلول الغسل بصورة جيدة .
ز – أضيف (1) مل من محلول المقترن الأنزيمي (Conjugate) في كل حوض
ح- كررت الخطوتين (هـ) و(و) .

ط- أضيف (1) مل من محلول المادة الأساس (المجهزة مع العدة) ، ثم غطيت الأحواض ووضعت على جهاز الهزاز لمدة (10-15) دقيقة .
ي- سحب محلول المادة الأساس ، ثم غسل الشريط بـ(2) مل من الماء المقطر لاربع مرات بصورة جيدة
ك- رفعت الأشرطة ووضعت على ورق نشاف حتى جفافها بصورة جيدة
ح- حددت النتيجة الموجبة عندما تكون شدة البقعة على (Brucella Ag) في شريط النموذج مساوية لشدة البقعة على شريط السيطرة الموجبة الضعيفة أو أعلى منها ، بينما تكون النتيجة سالبة إذا كانت شدة البقعة اقل من شدة البقعة على شريط السيطرة الموجبة الضعيفة .
م- حفظت الأشرطة في مكان مظلم وجاف .

النتائج والمناقشة

لمقارنة كفاءة الطرائق المصلية في تشخيص داء البروسيلات المتسبب عن الأنواع التابعة إلى جنس Brucella، استخدمت أربع طرائق شائعة الاستخدام في التشخيص هي [فحص الروزبنكال ، فحص التألق المناعي غير المباشر (IFAT) ، فحص الميركابتوايثانول (2ME) وفحص المقايسة المناعية بالأنزيم المرتبط (ELISA)] فضلاً عن طريقة إضافية تاكيدية تمت تجربتها لأول مرة في العراق وهي طريقة الفحص المناعي البقعي (Spot Immune Assay (S.I.A) للكشف عن الأجسام المضادة نوع IgG ضد بكتريا البروسيلا في مصول دم المرضى الذين يعانون من داء البروسيلات ، إذ حضرت هذه العدة من قبل د.عدنان هادي في وزارة الصحة ولم يتم لحد الآن الحصول على عدة مماثلة من أي من الشركات العالمية المتعاملة مع الشركة العامة لتسويق الأدوية. وفيما يلي مقارنة للنتائج التي أعطتها كل من الطرائق المصلية الخمس المستخدمة في تشخيص بكتريا البروسيلا وكفاءة كل طريقة في هذا المجال .

فحص روزبنكال Rose Bengal Test

أوضحت نتائج فحص روزبنكال لعينات دم مجموعة مرضى داء البروسيلات (جدول 1) والبالغة (100) عينة ومجموعة الأصحاء (معاملة السيطرة) البالغة (10)عينة ، ظهور (76) حالة موجبة وذلك خلال حصول تلازن أي امتلاكها للأجسام المضادة نوع IgM أو (IgG + IgM). أما الحالات السالبة أي تلك التي لم يتم الحصول فيها على تلازن والبالغة (24) حالة على الرغم من كون هذه الحالات مشخصة سريرياً بكونها حالات إصابة بداء البروسيلات . ومن بين هذه الحالات (24 حالة) السالبة لفحص الروز بنكال تم الكشف عن ثلاث حالات موجبة لفحص الاليزا والفحص المناعي البقعي

جدول (1):فحص روزبنكال في مجموعة المرضى المشكوك بإصابتهم بداء البروسيلا البالغ (100) حالة المشخصة سريرياً مقارنة بمعاملة السيطرة.

النتيجة	عينات المرضى		مجموعة الأصحاء (معاملة السيطرة)	
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
تلازن واضح	66	66	–	–
تلازن ناعم	8	8	–	–
تلازن بسيط	2	2	–	–
لا تلازن	24	24	10	100
المجموع	100	100	10	100

تشير نتائج حالات روزبنكال الموجبة إلى أن (66) حالة منها من مجموع حالات البروسيلا الكلية والبالغة (100) حالة أعطت تلازناً واضحاً بهذا الفحص ، تلتها (8) حالة أعطت تلازناً ناعماً ، فيما بلغت حالات التلازن البسيط (2) حالة وبذلك تكون مجموع عينات دم المرضى التي أعطت الأنواع الثلاثة من التلازن قد بلغت (76) حالة . ومن جهة أخرى لم تظهر (24) حالة بداء البروسيلات أي تلازن شانها بذلك شأن عينات معاملة السيطرة (الأصحاء) والبالغة (10) حالة التي لم تظهر هي أيضاً أي نوع من أنواع التلازن .

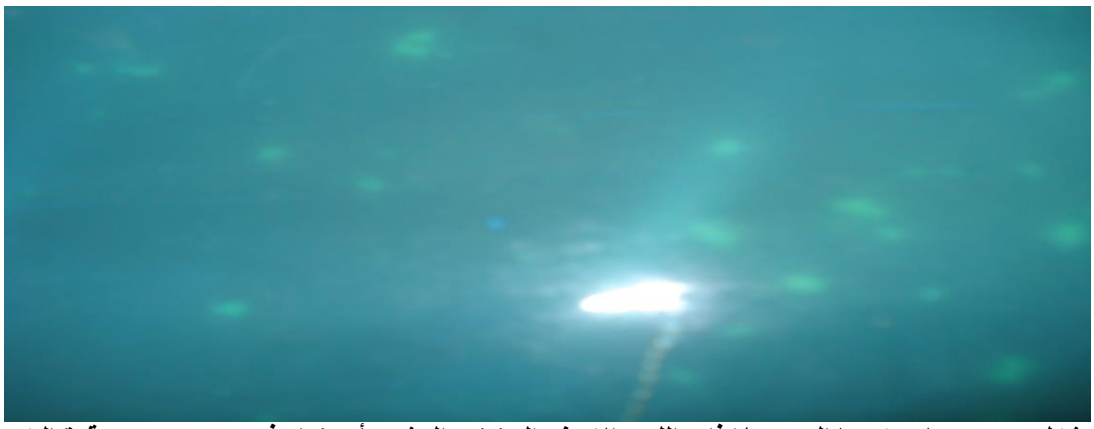
يعد فحص روزبنكال أحد الفحوصات شائعة الاستخدام التي تشغل حيزاً كبيراً في مختبراتنا التشخيصية كاختبار مسحي أولي ، سهل الإجراء وغير مكلف فضلاً عن حساسيتها وكفاءته الجيدة[7] . ويمتاز الفحص هذا أيضا بقدرته على الكشف عن الإصابة بداء البروسيلا في المراحل (المبكرة) من المرض بسبب كون الأجسام المضادة نوع IgM هي المتغلبة بعد الإصابة والأكثر فعالية من الأجسام المضادة نوع IgG .

ومن ناحية أخرى فان هذا الفحص يبقى موجباً لمدة سنة أو سنتين مما يولد صعوبة في تشخيص المرض ولا سيما في المناطق المتوطن فيها المرض أو لدى الأشخاص الذين هم بتماس مستمر ومباشر مع الحيوانات ، وهذا يدعوا إلى ضرورة استخدام فحص آخر لتأكيد حصول الإصابة[11,10,1]

فحص التألق المناعي غير المباشر Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)

يعد فحص الـ IFAT واحد من الفحوصات المصلية المهمة للكشف عن داء البروسيلات والتأكيدية لفحص الروزبنكال ، إذ يتحرى عن وجود الأجسام المضادة نوع IgG و IgM في

مصول المرضى ، كما موضح في شكل (1) الذي يظهر تالق الخلايا البكتيرية المستخدمة كمستضد Antigen اذ تظهر بشكل عصيات كروية ذات لون اصفر مخضر ، مما يدل على وجود الأجسام المضادة من النوعين المذكورين في مصول المرضى.



شكل (1) عصيات بكتريا البروسيلا ذات اللون الاصفر المخضر المشع بأستخدام فحص IFAT (قوة التكبير 1250

يشير الجدول (2) إلى عدد الحالات المشخصة بفحص الـ IFAT ، إذ بلغت (28) حالة من مجموع (76) حالة موجبة لفحص روزبنكال ، وهي بذلك تمثل نسبة 36.84% من مجموع حالات روزبنكال ، ويدل هذا على أن هنالك (48) حالة سالبة والتي لا تتطابق مع الفحص الروتيني للبروسيلا (روزبنكال). ومن مجموع (24) حالة سالبة لفحص روزبنكال أعطت (3) حالات منها نتيجة موجبة لفحص الـ IFAT لتشكل نسبة 12.5%.

أما بالنسبة للأشخاص الأصحاء (معاملة السيطرة) فقد كانت جميع عينات الدم التي أخذت منهم والبالغة (10) عينة سالبة لفحص الـ IFAT مما يؤكد عدم إصابتهم بأي نوع من أنواع البروسيلا .

جدول (2) نتائج فحص التألق المناعي (IFAT) للأصحاء ومجموعة المرضى المشكوك بإصابتهم بداء البروسيلات اعتماداً على فحص روزبنكال.

المجموعة	نتيجة فحص روزبنكال	عدد الحالات	نتيجة فحص IFAT				المجموع
			+		-		
			العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	
المرضى	موجب	76	28	36.84	48	63.15	76
	سالب	24	3	12.5	21	87.5	24
الأصحاء	سالب	10	-	-	10	100	10

2- فحص الميركابتوايثانول Mercaptoethanol (2ME)

يعد فحص الـ 2ME من الفحوصات المهمة لتحديد نوع الأجسام المضادة المسؤولة عن أحداث التلازن في فحص روزبنكال، وهو من الفحوصات التأكيدية المهمة لمتابعة الحالة المرضية للمريض المصاب بداء البروسيلات، إذ تعمل مادة 2ME على تحطيم الكلوبيولين المناعي نوع IgM دون تأثيرها على الكلوبيولين المناعي نوع IgG ، لذا فإن هذا الاختبار يعد على جانب كبير من الأهمية لقدرته على تمييز الحالة المزمنة عن الحالة الحادة للمرض [12] .

يشير جدول (3) إلى عدد الحالات المشخصة باستخدام فحص الـ 2ME والذي يتحرى عن وجود الأجسام المضادة نوع IgG في مصول المرضى. ويلاحظ من النتائج أن عدد الحالات الموجبة لهذا الفحص بلغت (37) حالة من مجموع (76) حالة موجبة لفحص روزبنكال وتمثل هذا العدد المرضى المصابون بداء البروسيلات في الطور الحاد من المرض (Acute) أو ممن كانت لديهم إصابة فعالة (Active Infection) . وجاءت هذه النتائج مقاربة لما وجدوه [13] . من أن النسبة المئوية باستخدام فحص الـ 2ME كانت مساوية النسبة المئوية في هذه الدراسة.

أما الحالات السالبة لهذا الفحص والتي بلغت (39) حالة من مجموع (76) حالة الموجبة لفحص روزبنكال ، وهذا العدد يمثل المرضى الذين تكونت لديهم أجساماً مضادة نوع IgM ، وهم أما أن يكونوا في الطور المزمن من المرض أو أنهم في الطور الحاد منه ولم تتكون لديهم بعد الأجسام المضادة نوع IgG ، أو أن الأجسام المضادة نوع IgG المتكون لديهم تكون بتراكيز واطئة مما يجعل من الصعوبة على فحص (2ME) تحسسها .

يعد فحص 2ME من الفحوصات البسيطة المتبعة في بعض المؤسسات الصحية العراقية [15,14]

أما نتائج الحالات السالبة لفحص روزبنكال والبالغة (24) حالة فقد كانت جميعها سالبة أيضاً لفحص (2ME) مماثلة بذلك لنتائج الأشخاص الأصحاء (معاملة السيطرة) والبالغة (10) حالة

جدول (3) نتائج فحص الـ (2ME) للأصحاء ومجموعة المرضى المصابون بداء البروسيلات اعتماداً على فحص روزبنكال.

نتيجة فحص روزبنكال	عدد الحالات	نتيجة فحص 2 ME				المجموع
		+		-		
		العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	
الموجب (وجود تلازن)	76	37	48.68	39	51.31	76
السالب (عدم وجود تلازن)	24	-	-	24	100	24
سالب مجموعة الأصحاء (معاملة السيطرة)	10	-	-	10	100	10

يمثل جدول (4) مقارنة بين نتائج الفحص المصلي (2ME) لكل من مجموعة المرضى المصابون بداء البروسيلات اعتماداً على فحص روزبنكال والبالغة (76) حالة مع معاملة السيطرة بالـ Normal Saline . وإن وجود (76) حالة موجبة بفحص روزبنكال يعد دليلاً على وجود الأجسام المضادة نوع IgM وIgG أو IgM فقط. وعند إجراء معاملة السيطرة بالـ Normal Saline على هذه الحالات لمعرفة مدى تأثير التخفيف الحاصل في محلول 2ME على الأجسام المضادة ، وجد أن (74) حالة منها ظلت موجبة في حين أعطت (حالتان) منها فقط نتيجة سالبة بالـ Normal Saline . ويعزى ذلك إلى أن تخفيف تراكيز الأجسام المضادة الموجودة في المصل أدى إلى عدم إمكانية محلول الروزبنكال عن الكشف أو التحسس الكامل لهذه الأجسام المضادة بعد التخفيف في قليل من الحالات .

جدول (4) نتائج فحص الـ (2ME) في مجموعة المرضى المصابين بداء البروسيلا اعتماداً على فحص روزبنكال مقارنة بمعاملة السيطرة الـ Normal Saline.

الحالات الموجبة للفحص السريري والفحص المصلي روزبنكال	محلول 2ME		معاملة السيطرة (Normal Saline)	
	أ +	-	ب +	-
(76) حالة	37	39	74	2

(أ) = وجود أجسام مضادة نوع IgG .
(ب) = وجود أجسام مضادة نوع IgM أو (IgG + IgM)

فحص المقايسة المناعية بالأنزيم المرتبط (الأليزا) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

يعد فحص الأليزا من أحد الاختبارات التأكيدية المهمة للكشف عن الأجسام المضادة النوعية نوع IgG ضد بكتريا البروسيلا ، كما إنه يمتاز بالحساسية العالية الضرورية للتمييز بين الحالة الحادة للمرض والتي يوجد بها IgM ،عن الحالة المزمنة المتكون فيها IgG، [17,16]. وبذلك فإن النتيجة الموجبة التي تنتج عن الفحص تدل على وجود الأجسام المضادة نوع IgG هي دليل على أن المصاب بداء البروسيلات هو في الطور الحاد من المرض أو أنه في حالة الإصابة الفعالة.

ويشير الجدول (5) إلى إيجابية (46) حالة من مجموع (76) حالة مشخصة بفحص روزبنكال هي موجبة لهذا الفحص ، فيما كانت (30) حالة سالبة له من مجموع الـ (76) حالة الموجبة بفحص روزبنكال.

وتمثل النتائج الموجبة لهذا الفحص المرضى المصابون بداء البروسيلا في الطور الحاد أو أن لديهم إصابة فعالة ، إذ أن فحص الأليزا الذي استخدم في هذه الدراسة قد كشف عن وجود الأجسام المضادة نوع IgG . أما الحالات السالبة لهذا الفحص فهي تمثل المرضى الذين لديهم أجساماً مضادة نوع IgM والذين هم في الطور المزمن للمرض لإيجابية فحص روزبنكال لديهم.

وبينت النتائج أيضاً إلى أن (3) حالات من مجموع (24) حالة سالبة لفحص الروزبنكال والمشخصة سريرياً أيضاً كانت موجبة لفحص الأليزا من الـ (24) حالة سالبة لفحص الروزبنكال، ويعزى الكشف بطريقة الأليزا عن هذا العدد من الحالات الموجبة إلى صفة الحساسية والخصوصية (Sensitivity and Specificity) العاليتين اللتين يتميز بهما فحص الأليزا المصلي مقارنة بالفحصين المصلين (روزبنكال ، 2ME) اللذان لم يتمكنا من التحسس لهذه الحالات، وبذلك تبرز أهمية فحص الأليزا في الكشف عن داء البروسيلا. وهذا يتطابق مع ما أشار إليه [18] في دراستهم المصلية التي أثمرت عن التوصية بكون فحص الأليزا هو أكثر أهمية في التحسس عن التراكيز الواطئة للأجسام المضادة من فحص الروزبنكال.

جـدول (5) نتـائج فحـص الأليـزا (ELISA) للأصـحاء ومجموعـة المرضـى المصـابون بـداء البروسيلا.

المجموعة	نتيجة فحص روزبنكال	عدد الحالات	نتيجة فحص ELISA				المجموع
			+		-		
			العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	
المرضى	موجب حصول تلازن	76	46	60.5	30	39.4	76
	سالب (عدم حصول تلازن)	24	3	12.5	21	87.5	24
الأصحاء	سالب (عدم حصول تلازن)	10	-	-	10	100	10

الفحـص المنـاعي البقعـي (المبقـع) Spot Immune Assay (SIA)

يعـد هـذا الفحـص مـن الفحوصـات الجديـدة التـي تستخدم لأول مرة في العراق للكشف عن الأجسام المضـادة نـوع IgG فـي مصـول المرضـى الـذين يعانون من داء البروسيلا.

يلاحظ من النتائج المشار إليها في جدول (6) إن من بين (76) حالة موجبة لفحص روزبنكال كانت (46) منها موجبة لفحص الـ (SIA) وهي مساوية مع تلك التي أظهرها فحص الأليزا مما يؤكد دقة وأهمية هذه الطريقة المصلية الحديثة في الكشف عن حالات داء البروسيلات، وتتطابق هذه النتائج [20,19] الذين أشاروا إلى حصولهم على نسب متساوية لكل من فحصي الأرتشاف المناعي (Immunoblot analysis) وفحص الأليزا في الدراسة المصلية التي قاموا بها للتحري عن وجود الوصمة للأجسام المضادة النوعية ضد بكتريا البروسيلا في مصول الحيوانات المستخدمة في تجاربهم .

جـدول (6) نتـائج فحـص الـ (SIA) للأصـحاء ومجموعـة المرضـى المصـابون بـداء البروسـيلا اعتماداً على فحص روزبنكال.

المجموعة	نتيجة فحص روزبنكال	عدد الحالات	نتيجة فحص SIA				المجموع
			+		-		
			العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	
المرضى	موجب	76	46	60.5	30	39.4	76
	سالب	24	3	12.5	21	87.5	24
الأصحاء	سالب	10	-	-	10	100	10

المصادر:

1- Franco,M.P.;Mulder,M.;Gilman,R. H. and Smits,H.L.2007. Human brucellosis .Lancet Infect Dis.7(12):775-86.

2.Hasanjani,M.R.;Mohre,M.;Smailneijad,G.;Soleimani,A.;Hajiahmadi,M. 2004.Epidemiological features and clinical manifestation in 469 adult patients with brucellosis in Babol ,Northern Iran .Epidemiol Infect. 132(6):1109-14.

3-Godfriod,J.; Cloeckaert,A. and Liantard, J.P.2005. From the discovery of the Malta fever' s agent to the discovery of a marine mammals reservoir brucellosis has continuously been are –emerging zoonsis.Vet.Res.36(3):313-26.

4-Troy,S.B.;Richman,L.S.and Davis, C.E. 2005. Epidemiology and species related differences in acute clinical presentation. Medicine (Baltimore).84(3):174-87.

5-Alp,E.;Gudiol,F.and Pallares, A. 2006. Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis .BMC Infect Dis.6:72

6-Lecaroz,C.; Blanco- Prito, M.; Burrelle, M. A.2006.Intercellular killing of Brucella melitensis in human macrophages with microsphere– encapsulated gentamicin. J. Antimicrob chemother. 58(3):549-56.

7-Ruiz,J.;Sanchez,J.;Reguera,J.M.; Martin, L.; Lopez,S. ;and Colmenero, J.2005. Rose Bengal test :diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas.Clin. Microbiol.Infect.11(3):221-5.

8-Edwards , B. M. J. ; Tannahill , J. A. and Patricia, C. M. 1970. Comparison of IFAT with Agglutination, Complement fixation and Coomb's tests for Brucella antibody detection,. J. Clin. Path., 23: 161-165.

9-Catty, D. ; Ray, C. and Houds, V. 1983.Bench Manual of Techniques

for the preparation of Immunological and Immunodiagnostic Reagents. Part 1, WHO / IMM / PIR.83.1, Geneva . World Health Organization .

10-Kokoglu,O.F.; Hosoglu,S.; Geyik, M. F.;Ayaz,C. and Akalin,S. 2006.Clinical and laboratory features of brucellosis in two university hospitals in Southeast Turkey.Trop.Doct. 39(1):49-51.

11-Lapaque ,N.;Moriyon,I.and Mereno ,E.2005.Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor.Curr Opin Microbiol.8(1):60-6.

12-Andriopoulos, P.; Tsironi,M.; Deftereose,S.;Aessopos,A.and Assimakopoulose ,G. 2007. Acute brucellosis:presentation, diagnosis,and treatment of 144 cases .Int.J.Infect Dis.11(1) 52-7.

13-Gandara , B.; Zheludkov , M. M. and chernysheva , M. I. 1999. An evaluation of the effectiveness of Laboratory diagnostic methods for brucellosis . Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., (4) : 55-58 .

14-Klein , G. C. and Behan , K. A. 1981. Determination of Beucella Immunoglobulin G Agglutinating Antibody Titer with Dithiothreitol. J. Clin. Microbiol. 14(1) : 24-25

15-Hall , C. B. ; Halsey , N. A.; Marcy , S. M. ; Pickering, L.K. and Orenstein, W. A. 1997. Red Book : Report of the Committee on Infections disease . 24th ed. American Academy of Pediatrics . North west Point Blvd. P: 100-104.

16-Weir, D. W. 1978. Application of Immunological Methods . 3rd ed. Blake well Scientific publications. Boston MelBourne P:204.

17-Baldi,P.C.;Mignel,S.E. and Fossati, C.A.1996. Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of Brucella species.Clin.Infect Dis.22(3):446-55.

18-Szulowski, K. Lwanik, W.; Truzczynski , M. and Chrobociska , M.1999. The ELISA for the examination of here sera for anti-Brucella antibodies comp. Immunol . Microbiol. Infect. Dis 22(1):33-40 .

19-Cloeckaert , A. ; Kepkhofs , P. and Limet , J. N. 1992. Antibody response to Brucella outer membrane proteins in bovine brucellosis : Immunoblot analysis and Competitive enzyme – Linked immunosorbent assay using monclonal antibodies J. Clin Microbiol., 30(12) : 3168- 3174.

20-Edmonds , M. D.; Shurig, G. G. ; Samartino, L. S. ; Hoyt, P. G. ; Walker. J.V. ; Hagins , S. D. and Elzer , P. H. 1999a . Biosafety of Brucella strain RB51 For Vaccination of Mature bulls and pregnant heifers . Am. J.Vet. Res. 60(6) : 722-725 .

Comparison between the efficiency of serological tests for Identification of Brucellosis

*Anan hade** *Kefah A. Jasem** *Karema H. Hamade**
*Zeaid H. Abood**

*Microbiology/Center populic Heath Lab

Abstract

Five serological methods for detection of Brucella were compaired in this study, Four of the methods are commonely used in the detections:-

1-Rose-Bengal: as primary screening test which depends on detecting antibodies in the blood serum.

2-IFAT: which detects IgG and IgM antibodies in the serum.

3-ELISA test: which detects IgG antibodies in the serum.

4-2ME test: which detects IgG antibodies

The fifth methods. It was developed by a reasercher in one of the health centers in Baghdad. It was given the name of spot Immune Assay (SIA).

Results declares that among (100) samples of patients blood, 76, 49, 49, 37, and 28. samples were positive to Rose Bengal, ELISA, SIA, 2ME and IFAT tests, respectively.

When efficiency, sensitivity and specificity of the serological methods were compaired, the Following results were obtained:

a) ELISA and SIA were superiors among the other confirming methods (2ME and IFAT) in detecting the highest cases (49 cases); 46 of them were from the (76) cases positive to Rose Bengal The confirmatory test 2ME was not efficient in detecting low concentrations of IgG antibodies when less than half (37) of the total positive cases (76) were detected by this test.

b) IFAT test was the least efficient confirmatory test among all other test.

c) As a new confirmatory test, SIA proved to be an efficient and serological test for Brucella detection in comparison with other tests. It is an easy to use test, rapid and could be performed without need to the expensive equipment .