استخدام فحص ELISA في تشخيص جرثومة *Salmonella typhi* وتقييم نتائج اختبار ويدال Widal Test

محسن ايوب عيسى[1] و بشرى دلي حمد[2]

(استلم ٢٣ / ٥ / ٢٠٠٧ ، قبل ١٤ / ١١ / ٢٠٠٧)

[1]قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

[2]قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

الملخص:

اجري هذا البحث بهدف دراسة امكانية استخدام فحص الاليزا Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) في تشخيص جرثومة *Salmonella typhi* المسببة للحمى التايفوئيدية ومن ثم استخدام هذا الفحص لتقييم نتائج اختبار ويدال Widal Test الذي يجرى في مختبرات التحليل البكتريولوجي حيث اظهرت النتائج ان هنالك تبايناً في قابلية المستضدات المختلفة في التحسس والتحري عن الاجسام المضادة لهذه الجرثومة ووجد ان اعلى حالة تحسس كانت باستخدام المستضد الجسمي (O) والمستضد السوطي (H) ووجد ان النتائج الموجبة قد ازدادت باستخدام طريقة الـ ELISA مقارنة بفحص ويدال .

المقدمة:

يعد اختبار الـ ELISA من الاختبارات الحديثة والمتقدمة في عملية تشخيص جرثومة الحمى التايفوئيدية وهو من الاختبارات المناعية السريعة والحساسة لقياس معيار الاجسام المضادة في مصل المصابين بالإمراض الجرثومية وكانت الحمى التايفوئيدية أحد الحقول المهمة لتطبيق هذه التقنية وفي مقدمة الباحثين في هذا المجال الباحث(Nassau) وجماعته عام ١٩٧٦ الذين استخدموا مستضد جرثومة *S.typhi* وكأي اختبار مناعي فأن طبيعة المستضد المستخدم في الاختبار هي احدى العوامل المهمة التي تحدد حساسية هذا الاختبار وما زالت تقنية ELISA تستخدم في دعم تشخيص اصابات الحمى المعوية ومعظم التحورات والتطوير الحاصل على هذه التقنية هو استخدام انواع مختلفة من المستضدات التي يرافقها تغير في حساسيتها وخصوصيتها في التشخيص المناعي لهذا المرض [١] ، [٢] .

يشمل اختبار ELISAعادةً التحري عن الكلوبيولين المناعي IgG ويعد فحص IgG-ELISA حاليا من اكثر الطرائق الدقيقة المستعملة للكشف عن الاجسام المضادة لجرثومة السالمونيلا ويعتمد على استخدام الجرثومة باكملها والمتكونة اغلبها من بروتين الغشاء الخلوي او ان تستخدم المستضدات الذائبة اذ يلصق المستضد بالسطح الداخلي للحفر المصنعة من البولسترين والمرتبة بشكل صفائح لقياس المعيارية Microtitre ، عند اضافة المصل المراد اختباره الى الحفر لتلصق الاضداد الموجودة فيه على المستضد الملتصق بالحفر ، فيتم الكشف عن الاضداد المرتبطة بالمستضد باضافة مضاد الجسم المضادAnti antibodies والمعلم بالانزيم فيتم القياس الكمي للانزيم باضافة المادة الاساس ليعطي تفاعله معها اللون الذي يمكن قياس شدته التي تتناسب مع كمية الاضداد المرتبطة ، وفي عام (١٩٨٠) ابتكرت تقنية جديدة للتحري عن الكلوبيولين المناعي المتخصص IgM باستخدام اختبار ELISA لتشخيص حمى التايفوئيد [٣] ، [٤] .

اجريت هذه الدراسة بهدف معرفة مدى امكانية استخدام فحص ELISA في التشخيص المناعي لمرض حمى التايفوئيد وتقييم نتائج اختبار ويدال الذي يجرى في مختبرات التحليل البكتريولوجي المختلفة في محافظة نينوى .

المواد وطرائق العمل:

١ – المواد:

المحاليل المستخدمة في تجارب ELISA [٥].

– بفر الكاربونيت Carbonate Buffer

كاربونات الصوديوم (١,٥٩) غم

بيكاربونات الصوديوم (٢,٩٣) غم

الماء المقطر (١٠٠٠) سم^3

تذاب المواد ويضبط الأس الهيدروجيني على (٩,٦) .

– بفر ملح الفوسفيت الفسلجي Phosphate Buffer Saline (PBS)

فوسفات البوتاسيوم (٠,١٤٤) غم

فوسفات الصوديوم (٠,٧٩٥) غم

كلوريد الصوديوم (٩,٠) غم

الماء المقطر (١٠٠٠) سم^3

تذاب المواد تباعاً في الماء المقطر ويضبط الأس الهيدروجيني على (٧,٤)

– محلول مثبت المستضد (PBS containing 5% BSA + 0.05 (TT)

البومين المصل البقري Bovin Serum Albumin (BSA) (٥٠) غم

توين Tween 20 (TT) (٠,٥) غم

PBS (١٠٠٠) سم^3

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- محلول مخفف المصل (PBS containing 1% BSA + 0.05 TT)

BSA (١٠,٠) ملغم

TT (٠,٥) غم

PBS (١٠٠٠) سم^{٣}

- والمحاليل الآتية محضرة تجارياً (Biokit, Spain)

(١) المقترن بالأنزيم المركز Concentrated conjugate عبارة عن Rabbit Anti – Human IgG Antibody المقترن بانزيم Horse radish peroxidase

(٢) المادة الأساس Substrate عبارة عن Citrate – Acetate Buffer containing Hydrogen peroxide

(٣) المادة الصبغية Chromogen وهي 3-3`, 5-5` Tetra Methyl Benzidin (TMB) المذابة في Dimethyl sulphoxid (DMSO)

محاليل المستضدات التجارية المستخدمة لاختبار ELISA

أستخدمت المستضدات التجارية الآتية والمصنعة من قبل شركة (Plasmate Laboratory Products Limited.UK.) :

Salmonella typhi O	Salmonella typhi H
Salmonella O paratyphi A	Salmonella H paratyphi A
Salmonella O paratyphi B	Salmonella H paratyphi B
Salmonella O paratyphi C	Salmonella H paratyphi C

٢- طريقة العمل:

تم جمع ١١٠ عينة دم من المرضى الذين يعانون من حمى التايفوئيد للفترة من ١/٧ - ٢٠٠٤/٩/١ وقد وقع الاختيار على عشرين نموذج ، قسمت عينة الدم المسحوبة الى قسمين :

القسم الأول اجري له فحص ويدال (استخدام المصل) في مختبرات التحليل البكتريولوجي في محافظة نينوى وسجلت النتيجة .

أما القسم الثاني فقد استخدم في فحص ELISA (استخدم المصل) وقد وقع الاختيار على ٢٠ عينة متنوعة في نتائجها لاختبار ويدال وقورنت النتائج علماً أن نتائج فحص ويدال في المختبرات قد حولت إلى قيم كثافة ضوئية Optical density بطريقة رياضية بالإستعانة بقيم Positive control و Cut off level في تجربة ELISA لغرض توحيد النتائج واجراء المقارنة .

اجري فحص ELISA استنادا الى : [٦] ، [٥] .

*** تثبيت المستضدات :**

أخذت صفيحة بولي أستيرين معقمة وثبتت المستضدات وكما يأتي :

أ- أضيف ما مقداره (١٠٠) مايكروليتر من كل مستضد إلى الحفر في الصفيحة وحفظت بدرجة (٤) ° م مدة ليلة واحدة .

ب- أزيل المحلول المتبقي من المستضد وأضيف (٢٠٠) مايكروليتر من محلول مثبت المستضد (PBS containing 5% BSA + 0.05% TT). وحفظت ساعتين بدرجة حرارة (٣٧) ° م .

جـ- بعد مرور الساعتين أزيل المحلول المثبت وغسلت الصفيحة ثلاث مرات بالبفر ولأجل تأكيد عملية التثبيت أضيف محلول تثبيت المستضد ثانية (٢٠٠ مايكروليتر) وترك لمدة (١٨) ساعة بدرجة (٤) ° م ثم أزيل المحلول المثبت وغسلت الصفيحة بالبفر ثلاث مرات وتركت بدرجة (٤) ° م لحين الاستخدام .

*** طريقة الإختبار :-**

أ- أضيف ما مقداره (٢٠٠) مايكروليتر من مخفف المصل (PBS containing 1% BSA + 0.05% TT) إلى كل حفرة محملة بالمستضد .

ب- أضيف (١٠) مايكروليتر من المصل مع ملاحظة الإضافات في الحفر الآتية .

Positive control = وضع فيها مصل سيطرة موجب وغير مخفف .

Negative control = وضع فيها مصل سيطرة سالب وغير مخفف .

Blank control = لم يوضع فيها مصل .

حضنت الصفيحة بعد ذلك مدة ساعة بدرجة (٣٧) ° م .

جـ- أجريت عملية الغسل ثلاث مرات بإستخدام محلول PBS وقلبت الصفيحة على ورقة ترشيح لإزالة محلول الغسل الزائد .

د- أضيف (١٠٠) مايكروليتر من المحلول المقترن بالأنزيم إلى الحفر علماً أن هذا المحلول حضر قبل الإضافة وكما يأتي :

(١٢) سم^{٣} المحلول المخفف (PBS containing 1% BSA + 0.05% TT) + (٢٤٠) مايكروليتر من الأنزيم المركز المقترن بالأنزيم .

حضنت الصفيحة بعد ذلك مدة (٣٠) دقيقة بدرجة حرارة (٣٧) ° م

هـ- أضيف (١٠٠) مايكروليتر من مواد الصبغ المخفف بمحلول المادة الأساس الى كل حفرة ومن ضمنها البلانك . علماً أن المحلول في أعلاه حضر قبل الإضافة وكما يأتي :

(١٢) سم^{٣} من محلول المادة الأساس + (٢٤٠) مايكروليتر من محلول الصبغ المركز تركت الصفيحة بعد ذلك في الظلام مدة نصف ساعة وبدرجة حرارة الغرفة .

و- يضاف محلول ايقاف التفاعل Sulphuric Acid (1N) بمقدار (١٠٠) مايكروليتر اذ يتحول الى اللون الاصفر .

ز- بعد إيقاف التفاعل قرئت النتيجة على طول موجي (٤٥٠) نانوميتر على جهاز المطياف الضوئي الخاص باختبار الأليزا (Brganon Teknika-Belgeum).

ح- بعد الحصول على القراءات قيمت النتائج كما يأتي :

الموجبة الضعيفة = تمتلك قراءة كثافة ضوئية Optical Density (O.D) تساوي او أكثر من قيمة Cut off level وأقل من قراءة O.D للـ Positive control .

الموجبة القوية = تمتلك قراءة O.D تساوي أو أكبر من قراءة O.D للـ Positive control

السالبة = القراءة التي أقل من قيمة Cut off level .

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

النتائج والمناقشة:

اختيرت عشرون عينة دم كانت نتائج اختبار ويدال لعدد منها في المختبرات سالبا (٨ عينات) وكانت موجبة لاخرى فيما يتعلق بمستضدات جرثومة *S. typhi* الجسمية والسوطية (١٢ عينة) .

توضح الاشكال (١) و (٢) و (٣) نتائج هذا البحث باستخدام ثلاث مجموعات من المستضدات لبيان تاثير هذه المستضدات في حساسية الفحص كما ان نتائج فحص ويدال للمختبرات الذي اجري على العينات المختبرة حو ّ لت الى قيم كثافة ضوئية من اجل تمثيلها ومقارنتها بنتائج اختبار ELISA لهذه العينات .

وبالعودة الى الاشكال (١) و (٢) و (٣) يلاحظ ان هنالك تبايناً في قابلية المستضدات المختلفة على التحسس والتحري عن الاجسام المضادة لجرثومة *S.typhi* و *S. papratyphi* ويلاحظ ان اعلى حالة تحسس كانت عند استخدام المستضدات الخاصة بالمستضد الجسمي O والمستضد السوطي H لجرثومة السالمونيلا *S.typhi* الشكل (٢) اذ اظهرت حوالي (١٧) نتيجة موجبة قوية ضمن قياسات هذه الطريقة (النتيجة الموجبة القوية تساوي او اكبر من قيمة Positive control) ونتيجة موجبة ضعيفة واحدة (اكبر او تساوي قيمة Cut off level واقل من قيمة Positive control) . ونتيجتين سالبتين اقل من قيمة Cut off level الذي يمثل الحد الفاصل بين النتائج الموجبة والسالبة بهذه الطريقة تلت ذلك المستضدات الخام لجرثومة *S.typhi* في قابلية تحسسها للاجسام المضادة اذ اظهرت (٨) حالات موجبة قوية و (٨) حالات موجبة ضعيفة و(٤) حالات سالبة ولم يظهر اختلاف المستضد الخام فروقا واضحة في قابلية التحسس بين المستضدات المستخدمة على الرغم من التفوق البسيط للمستضدات الخام للسلالات المحلية الذي ربما كان اقدر في التحري عن الاجسام المضادة لاصابات محلية ايضا الشكل (١) .

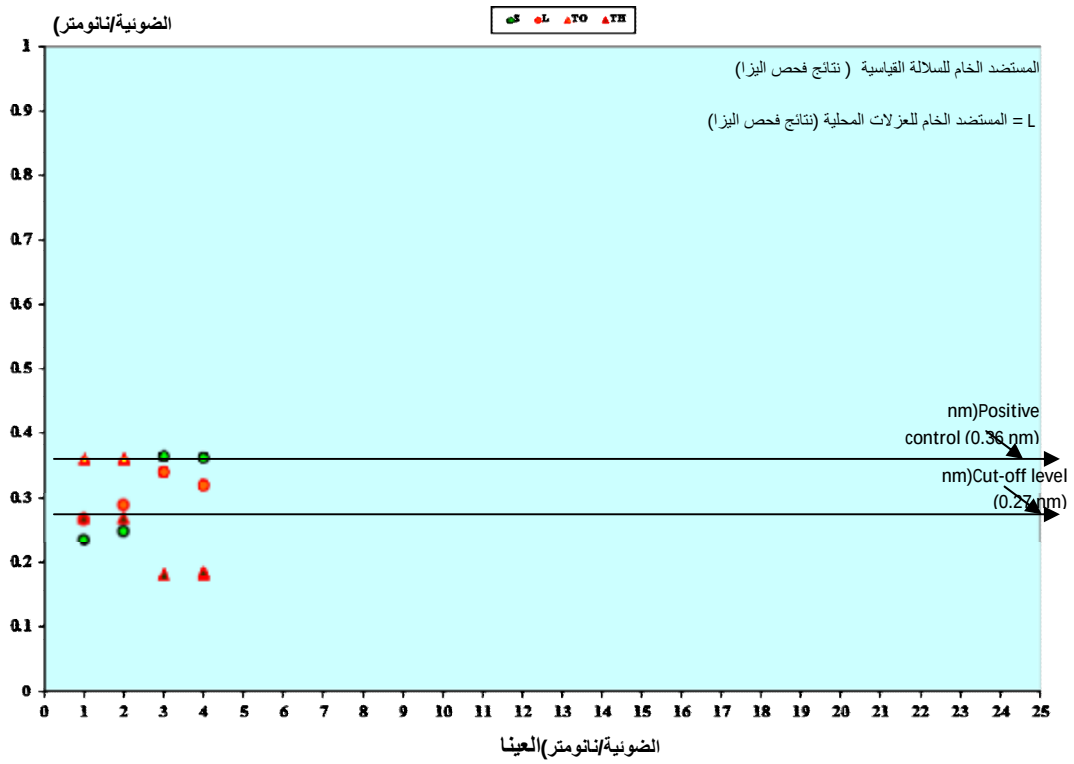
اما فيما يخص الشكل ٣ المتضمن نتائج اختبار ELISA باستخدام مستضدات B *S. paratyphi* فيلاحظ ان قابلية التحسس في هذه الحالة لم تكن بمستوى استخدام المستضدات السابقة ومع ذلك فقد ظهر أن هناك (٨) نتائج موجبة قوية و (٧) موجبة ضعيفة و(٥) سالبة لان هذه النتائج الموجبة قد تمثل تحسسا للاجسام المضادة الخاصة بجرثومة *S.* B *paratyphi* او قد يمثل عدد منها تفاعلا مشتركا مع الاضداد الخاصة بانواع اخرى من السالمونيلا او عدد من انواع العائلة المعوية نظرا للتشابه المستضدي [٧] ، [٨] .

كما ان النتائج الموجبة التي ازدادت باستخدام طريقة ELISA مقارنة بفحص ويدال للمختبرات وللمستضدات جميعا المستخدمة في هذه الدراسة قد ترتبط بدرجة التحسس العالية لهذه الطريقة [٩] ، [٢] او بالارتفاع الطبيعي لاضداد هذه الجراثيم لدى الافراد الاصحاء المتعرضين على نحو مستمر لهذه الجراثيم وما يقابل ذلك من قدرة تحسس عالية لهذه الطريقة كما ذكر انفا مما يستدعي اجراء دراسة بشأن معدل عيارية هذه الاضداد الخاصة بجرثومة *S. typhi* و *S. paratyphi* لدى الاشخاص الطبيعيين ضمن مجتمعنا ليتسنى وضع حد فاصل دقيق بين النتائج الموجبة والسالبة سواء لطريقة ELISA او أي اختبار مناعي يتحرى عن الاجسام المضادة لهذه الجراثيم فضلا عن اجراء دراسة لحاملي الجرثوم Carriers الذين يبقون محتفظين بعيارية عالية لهذه الاضداد مدة قد تكون طويلة [١٠] ، [١١] .

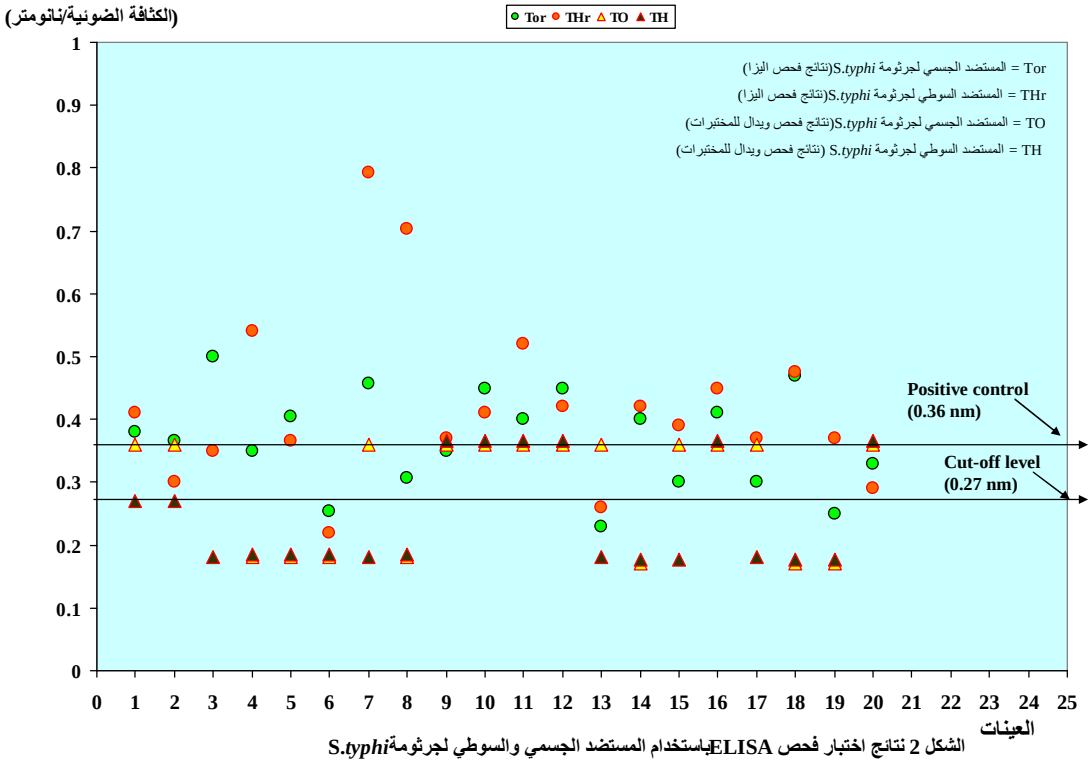
إن فحص ELISA هو احد الفحوصات المناعية المهمة والحساسة التي تستخدم غالبا لتشخيص الجراثيم ومن ضمنها جراثيم السالمونيلا اذ تستخدم عدة اساليب لاجراء هذا الفحص، الاساس فيها تطوير المستضدات المستخدمة وجعلها اكثر نقاوة وخصوصية بما يضمن الحصول على اعلى حساسية ممكنة لهذه الطريقة التي ظهرت كذلك اهميتها في التشخيص المبكر لبدء الاصابة [١٢] ، [١٣] . لقد اثبتت هذه الدراسة امكان استخدام فحص ELISA في التشخيص المناعي لجرثومة التايفوئيد بعد تثبيت الطريقة الملائمة والدقيقة لوضع الحد الفاصل بين النتائج الموجبة والسالبة (Cut of level) الذي يعتمد على نوع الجهاز المستخدم وطريقة اجراء الفحص وخاصة فيما يتعلق بنوع المستضد المستخدم الذي اظهرت الدراسة ان تغيره يؤدي الى تغيير في حساسية الفحص كما يجب استحضار العيارية الطبيعية لاضداد هذه الجراثيم لدى الاصحاء في المجتمع فضلا عن حاملي الجرثوم عند وضع المعايير لهذا الفحص .

ان اجراء فحص ELISA قد يكون مكلفا في حالة توفره ولكنه ممكن الاجراء وفي الامكان اعداده وتوفيره وخاصة ضمن المختبرات المرتبطة بمؤسسات الدولة وكذلك المختبرات الخاصة الجيدة ولاسيما عندما يكون الهدف الارتقاء بمستوى التشخيص المختبري للجراثيم ودقة الحصول على نتائجه وما يتبع ذلك من تشخيص دقيق للمرض ثم وصف دقيق للعلاج وانعكاس ذلك ايجابيا على المستوى الصحي للمجتمع .

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

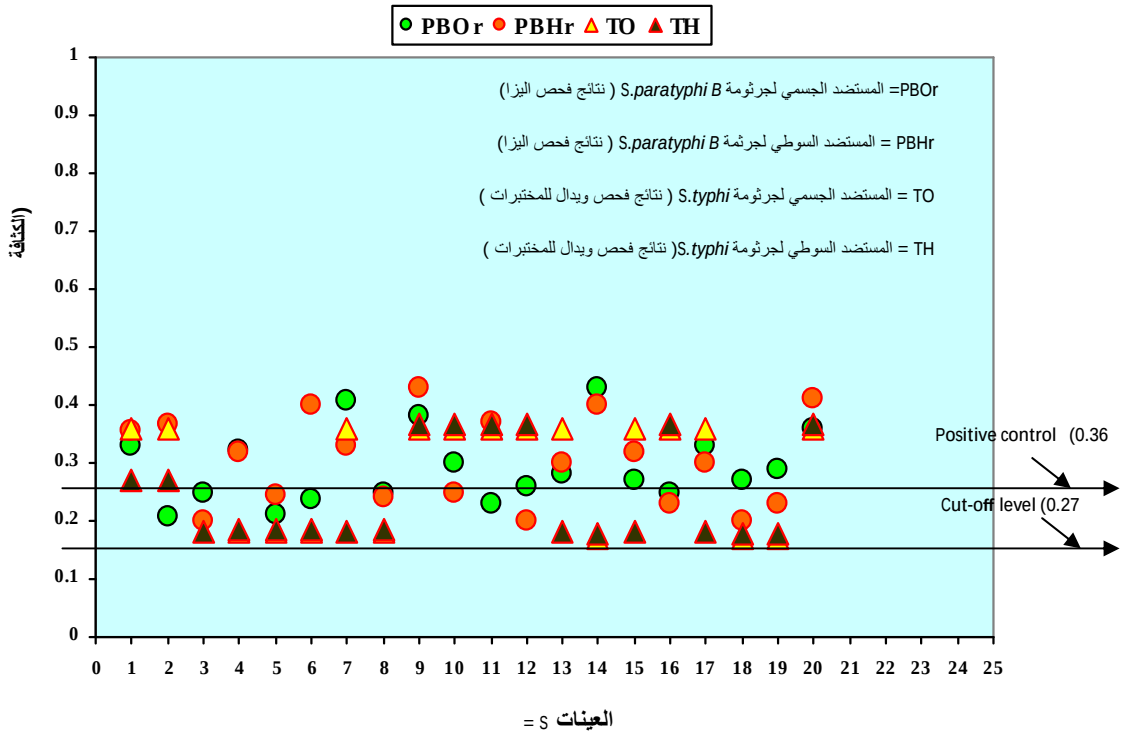


(الشكل 1): نتائج اختبار فحص ELISA باستخدام المستضد الخام لكل من العزلة القياسية والعزلات



الشكل 2 نتائج اختبار فحص ELISAباستخدام المستضد الجسمي والسوطي لجرثومةS.*typhi*

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com



(الشكل 3): اختبار فحص ELISAباستخدام المستضد الجسمي والسوطي لجرثومة*S.paratyphi B*(الكثافة)

المصادر:

1- P.H. Williams, M. Roberts and G. Hinson. Journal of Applied Bacteriology. Symposium Supplement., (1988): 1315-1475.

2- E.W. Koneman, S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger and W.C. Winn. Coloratlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. J. B. Lippincott Company, (1997). New York.

3- A.W. Woodruff. and S.G. Wright. Infections and Tropical Diseases. 3rd ed., Bristol., (1997): 103-111.

4- T.L. Wyant, M.K. Tanner and M.B. Sztein. Society of Microbiology Ah rights Reserved, American., (1999):1338-346.

5- A. Ostyn, M.A. Lanedle and M.F. Tnovel. Res Microbiol,(1997) 148: 491 – 500.

6- E. Sada, L.E. Ferguson, and T.M. Daniel. J. Infect. Dis., (1990), 162: 928 – 931 .

7- P.R. Edward and W.H. Ewing. Identification of Entrobacteriaceae. 3rd ed. Burgess publication Comp., (1972), Minneaoalis.

8- J.G. Collee, A.G. Fraser, B.P. Marmion and A. Simmons. Macie and McCartney Practical Medical Microbiolog. 14th ed. Churchill Livingstone Inc. (1996), New York.

9- D.P. Stites, J.D. Stobo, H.H. Fudenberg and J.V. Wells. Basic and Clinical Immunology. 4th ed. Card member. U.S.A., (1982):289.

١٠- الجبوري ، محيميد مدالله : علم البكتريا الطبية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل (١٩٩٠).

11- C.R.W. Edwards and I.A.D. Bouchier. Typhoid and paratyphoid fever. In: Davidson's principles and practice of medicine 19th ed. Churchill Livingstone. London., (2000): 122-132.

12- J.M.C. Luk. Bio Tech 17, (1994): 1038-1042.

13- J. Kritsana, K. Sunee, T. Hatairat and T. Sittichai. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Amreican., 7 (6) (2004): 977-979.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Use of ELISA Test in Diagnosis of *Salmonella typhi* and Evaluation of Widal Test

Muhsin A. Essa[1] and Bushra D. Hamad[2]

[1] ***Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq***
[2] ***Department of Biology, College of Education, University of Mosul, Mosul, Iraq***

Abstract:

The search was conducted to study the possibility to use Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) in diagnosis of *Salmonella typhi* that cause typhoid fever, then using ELISA evaluation of Widal Test which done in laboratories of bacteriological analysis. The results showed differences in the ability of various antigens in sensitivity and detection of *Salmonella typhi* antibodies, it was found that the higher sensitivity by using somatic antigen (O) and flagellar antigen (H) and it was found that the positive results were increased when ELISA method used in comparison with Widal Test.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com