

## تحضير عدة اليزا للكشف عن الإصابة بالبروسيلة

د. إبراهيم عبد الحسين الزبيدي\* د. أسيل محمد حمزة\* و د. جنان محمود خلف\*

تاريخ الاستلام: 2009/11/25

تاريخ القبول: 2010/4/1

## الخلاصة

تم تحضير مستضد مستخلص من عترة البروسيلة اللقاحية *Brucella melitensis* (Rev1) بطريقة التكسير بالأمواج فوق الصوتية ثم تم تحليل مكونات المستخلص البروتيني باستخدام الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي حيث تبين وجود 4 ذروات بروتينية عند التحليل بطريقة الترشيح الهلامي وكان هناك اختلاف كبير في الأوزان الجزيئية والمكونات البروتينية من الحزم المرحلة كهربائياً حيث ظهرت 3 حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين 478630 - 123060 دالتون.

تم إصابة مجموعة من خنازير غينيا *Guinea pigs* بعترة *Br. Melitensis* الضارية ومجموعة أخرى أصيبت بعترة *Br. abortus* الضارية وتم استخدام الذروات البروتينية المستخلصة بطريقة الهلام للكشف عن الإصابة بكائنا العترتين وكانت أفضل النتائج للذروة الثانية ذات المحتوى البروتيني (364.2 µg/ml) لفحص الاليزا حيث كشفت عن الإصابة بكائنا العترتين.

تم إجراء نفس البحث (الاليزا) باستخدام المستضد المحضر من العدة التشخيصية للأليزا والمنتجة من شركة Synbiotics حيث كشف عن الإصابة بـ *Br. Abortus* فقط وأعطت نتيجة سالبة للحيوانات المصابة بعترة *Br. melitensis*.

## Preparation of ELISA Kit for detection of Brucella infection

## Abstract

Preparation of antigen from *Br. melitensis* strain Rev1 was done by using ultrasonication, Column chromatography used to analysis of protein component of antigen; four peaks on chromatography were observed.

Electrophoresis techniques used for characterization of antigen, different in molecular weight (M.W) protein bands were showed in electrophoresis ranged between 478630-123060 Dalton.

A group of guinea pigs was infected experimentally with virulent strain of *Brucella abortus* & *Brucella melitensis*. Peak that obtained by chromatography were used to indicate Brucella infection with the 2 virulent strains (*Brucella abortus* & *Brucella melitensis*).

The best result obtained by using peak two which have the protein concentration 364.2 µg/ml a comparative study was done using a kit prepared by Synbiotics Company and the result was positive in *Brucella abortus* infection and negative in *Brucella melitensis* infection.

## المقدمة

في الأغلب متوافقة في حساسيتها النوعية لهاتين الجرثومتين [٧] فقد صممت هذه الدراسة والتي تهدف الى إنتاج مستضد للاستعمال في عدة تشخيص الاليزا يستطيع كشف الإصابة بالبروسيل ومقارنة ذلك بعده تشخيصية عالمية منتجة من شركة (Synbiotics) معتمدة في عملية تشخيص مرض البروسيليا في فحص الاليزا.

## المواد و طرائق العمل

## ١- تحضير المستضد:

١- حضر المستضد باستخدام عترة Rev1 حسب طريقة الباحث [٨] بطريقة التفسير بالأموح الفوق الصوتية وبعد ذلك اخذ السائل الطافي .

## ٢- فصل البروتينات بطريقة الترشيح الهلامي chromatography

استعمل في هذه التجربة عمود ذو أبعاد ٢.٥x١٠٠ ملم ثم استخدم هلام نوع (sephacryl S- 200) حيث كان معدل الفصل لكل أنبوب ٥ مل و بمعدل ٣٠ أنبوب ثم ثبتت سرعة مرور المحلول داخل العمود بمعدل ٢٠-٢١ مل بالساعة بعد ذلك تم قراءة الامتصاص الضوئي بجهاز قياس شدة الامتصاص الضوئي و بطول ٢٨٠ نانوميتر و تم رسم أشكال القمم أو الذروات التي تمثل قيم الامتصاص الضوئي التي أعطتها كل أنبوبة ثم تم جمع سائل الأنابيب الحاوية على تركيز عال من البروتين في كل ذروة لقياس نسبة البروتين فيها بطريقة [٩] .

## ٣- فصل بروتينات المستضد بطريقة

## الترجيل الكهربائي polyacrylamide gel electrophoresis

تم إجراء الترجيل الكهربائي لبروتينات المستضدات وفقا لطريقة [١٠] حيث جرى فصل البروتينات اعتماداً على أوزانها الجزيئية باستخدام خليط من البروتينات القياسية فصلت بذات الطريقة أعلاه ثم تم

هنالك العديد من التقنيات لتشخيص مرض البروسيليا وكل تقنية سجلت عليها ملاحظات سلبية بدءاً بالعزل الجرثومي حيث أشار الباحث [١] الى عدم عزل الجرثومة في الحالات الحادة عند وسط فترة تجرثم الدم، أما فحص الاليزا فيعد من أكثر الفحوصات السيرولوجية حساسية لكشف الإصابة بالمرض [٢] حيث أشار العديد من الباحثين الى أهمية فحص الاليزا لتشخيص مرض البروسيليا، إذ انه يحدد طور المرض سواء إن كان مزمن أو حاد [٣] ففي دراسة مقارنة أجراها الباحثون [٤] لاحظوا إن فحص الاليزا أكثر حساسية من فحص التلازن الأنوبي حيث إن الأخير لا يميز بين الإصابات الحادة و المزمنة في حين إن فحص الاليزا مناسب لتشخيص حالة المرض من خلال تشخيص نوع الاميونوكلوبولين وهو فحص حساس لتحديد IgG أو IgM إذا استخدما معاً، حيث اظهر نتائج متوافقة مع فحص التلازن الأنوبي و فحص كامب و ممكن اعتماده لتشخيص المرض في الإنسان حتى وان أظهرت نتائج الكامب سالبة لكونه فحص سهل و موثوق ويؤدي الى أفضل النتائج ذات العلاقة بالعلامات السريري [٥] كما انه يميز بين الحيوانات المصابة بالبروسيليا و الممنعة بعترة S19 و المصابة بجرثومة *Yersinia enterocolitica* O:9 نتيجة الحساسية العالية للفحص ٩٦.٢ % و خصوصية تصل الى ٩٩.٧% [٦] فيما أشار الباحث [٥] إن نسبة حساسية فحص الاليزا ١٠٠% و نسبة خصوصية ٧٥% إلا إن جميع العدد التشخيصية Kits التي تنتجها الشركات العالمية لاكتشف إلا عن الإصابة بذات النوع من الجرثومة الذي تم إكساء طبق التفاعل بمستضده وتكون الإصابة بهذه الجرثومة قد يتسبب عن جرثومتي *Brucella abortus* & *Brucella melitensis* حيث إن المضائف

أظهرت نتائج الترشيح الهلامي الجزيئي باستخدام هلام السيفاكلرل Sephacryl S200 وجود أربع ذروات بروتينية تم استخلاصها من العترة اللقاحية Rev1 وبطريقة التفسير بالأمواف فوق الصوتية كما في الشكل [1].

#### ٢. تقدير كمية البروتين

قيس تركيز البروتين لكل ذروة بطريقة [9] كما في جدول [1].

#### ٣. عملية الترحيل الكهربائي

##### ١.3 - البروتينات القياسية

أظهرت نتيجة عملية الترحيل الكهربائي للبروتينات القياسية ظهور خمسة حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين ١٤٧٠٠-١٥٠٠٠٠ دالتون، كما في جدول [2] و عند حساب الحركة النسبية للحزم البروتينية ظهر خط بياني يبين الحركة النسبية ولوغاريتم الوزن الجزيئي لهذه البروتينات بشكل مستقيم كما في الشكل [2] حيث إن تسلسل البروتينات القياسية حسب أوزانها الجزيئية يبدأ بأعلى نقطة ويمثلها بروتين الكاما وينتهي الخط بأقلها وزناً جزيئياً وهو بروتين اللايزوزايم Lysozyme.

##### ٢.3 المستضد المستخلص بطريقة التفسير بالأمواف فوق الصوتية

أظهرت النتائج عملية الترحيل الكهربائي لبروتينات ذروات المستضد المحضر بطريقة التفسير بالأمواف فوق الصوتية الى وجود ٣ حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين ٤٧٨٦٣٠ - ١٢٣٠٦٠ دالتون كما في جدول رقم [3] حيث تم إعطاء الرمز A1 - A3 البروتينات المفصولة في هلام متعدد الاكريلاميد.

وعند توزيع نقاط الحركة النسبية للبروتينات المفصولة وحسب مستوى حركتها في الأنبوبة المختبرية المعتمدة في طريقة الفصل تم رسم خط بياني يوضح توزيعها حول الخط البياني للبروتينات القياسية كما هو في الشكل [3].

ويوضح الشكل [4] شكل وانفصال الحزم البروتينية لبروتينات مستضد العترة Rev1

حساب الحركة النسبية للبروتينات كما يلي : الحركة النسبية = خطأ!

وحسبت الأوزان الجزيئية عن طريق مقارنة حركتها النسبية مع الخط البياني للوغاريتمات الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية .

#### ٤ - إصابة حيوانات التجربة

تم تقسيم حيوانات التجربة الى مجموعتين حيث ضمت كل مجموعة ١٠ حيوانات من الفأران المختبرية و من كلا الجنسين حيث أصيبت المجموعة الأولى بعترة البروسيلة المالطية وبجرعة إصابة  $1 \times 10^6 / 0.1$  مل تحت الخلب فيما أصيبت المجموعة الثانية بعترة البروسيلة المجهضة و بجرعة إصابة  $1 \times 10^6 / 0.1$  مل تحت الخلب و بعد مرور أسبوعين من الإصابة تم قتل الحيوانات المختبرية وجمعت عينات الدم في أنابيب زجاجية معقمة لغرض الحصول على السيرم وأخذت عينات الكبد و الطحال لغرض الزرع البكتريولوجي.

#### ٥ - فحص الاليزا

اجري هذا الفحص على خمسة مراحل المرحلة الأولى عد مستضد الذروة الأولى هو أداة الفحص حيث تم إكساء طبق المعايرة به ،وفي المرحلة الثانية استعمل مستضد الذروة الثانية كمستضد إكساء لغرض الفحص أما في المرحلة الثالثة و الرابعة فتم استعمال مستضد الذروة الثالثة و الرابعة على التوالي وفي المرحلة الخامسة اجري هذا الفحص باستخدام عدة فحص جاهزة Kit منتجة من شركة SYNBIOTICS الفرنسية و حسب تعليمات الشركة لسيرمات الحيوانات المصابة بالبروسيلة المالطية مرة و البروسيلة المجهضة مرة أخرى. تم بعد ذلك قراءة نتائج التفاعل لكل حفرة من طبق المعايرة باستخدام جهاز ELISA Reader إذ سجلت الكثافة الضوئية لكل عينة على طول موجي ٤٥٠ نانوميتر.

#### النتائج

##### ١ - نتائج طريقة الترشيح الهلامي

تملك أعلى نسبة من طبقة البيتايدوكلايان ،وقد يعود السبب في ذلك الى احتواء الفمة الثانية على تركيز بروتيني عالي وهذا يوافق ما توصل إليه [١٦] ما فيما يخص أوطاً النتائج فقد سجلت عند استعمالنا للعدة التشخيصية المنتجة من شركة Synbiotics فيعود ذلك لان مستضدات الاكساء المستعملة هو لجرثومة البروسيليا المجهضة و الذي لا يستطيع الكشف إلا على الإصابة بهذه الجرثومة وفقاً لكونها لاتملك إلا ثلاثة مستضدات من أصل ١٢ مستضد ٩ منها مشتركة تمتلكها جرثومة البروسيليا المالطية [١٧].

## References

- [1] Cassataro, J.; Estein, S.M.; Pasquovich, K.A.; Velikovskiy, C.A.; Barrera, S.; Bowden, R.; Fassati, C.A. and Giambartolomei, G.H. (2005). Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4<sup>+</sup> T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. . Infect. Immun. 73(12):8079-8088.
- [2] Bercovich, Z. (1998). Maintenance of *Brucella abortus* free herds: A review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing Brucellosis in areas low prevalence. Vet. Quart. 20:81-88.
- [3] Apan, T.Z.; Yildirim, M. and Istanbuluoğlu, E. (2007). Seroprevalance of

المحضر بالتكسير مقارنة مع شكل و انفصال الحزم البروتينية القياسية.

## ٣- نتائج فحص الاليزا

أظهرت نتائج فحص الاليزا تفاوتاً كبيراً في معدلات الكثافة الضوئية كما موضح في الجدول رقم [٤] و [٥].

## المناقشة

تم اختيار العترة *Brucella Rev1 melitensis* اعتماداً على النتائج التي ذكرها [١١] من أنها أكثر العترة امتلاكاً لعناصر

التشابه إذ استعملت كلقاح للأبقار و أعطت استجابة مناعية جيدة ضد جرعة التحدي بالعترة الضارية لجرثومة البروسيليا المالطية في الأبقار [٢١، ١٣].

أظهرت النتائج إن شدة الامتصاص و التي تعكس دورها حجم معيار الأجسام المضادة المتولدة ضد جرثومة البروسيليا كانت مرتفعة عند استخدام مستضدات ذراري التكسير لعترة Rev1 كمستضد إكساء أو أداة فحص ضد الإصابة بجرثومتي البروسيليا المجهضة و المالطية الضاريتين وقد يعود السبب في ذلك الى إن أجناس البروسيليا تعود الى جنس واحد لما تمتلكه من مشتركات مستضدية [١٤] ، أما تفوق معدلات قراءة شدة الامتصاص للقامة الثانية يعود ذلك الى وجود تركيز عال من الأجسام المضادة المتوافقة تماماً مع المستضد في هذه الذروة وقد يعود السبب في ذلك الى الطبيعة البروتينية للذروات و احتوائها على أجسام مضادة بدرجة واضحة [١١]، وتختلف نتائج هذه الدراسة مع ما حققه [١١] حيث حصل على أفضل النتائج للذروة الأولى وقد يعود السبب في ذلك الى انه استخدم طريقة استخلاص البروتينين بطريقة الترسيب بحامض الخليك ثلاثي الكلور و الترسيب بالفينول مما يؤدي الى إهمال أجزاء بروتينية من الجرثومة بينما لا يحدث ذلك في عملية التكسير المستعملة في هذه الدراسة [١٥] ، حيث ان الباحث أشار عند تفسيره لذلك أن الذروة الأولى

- للبروسيلات المنتجة محلياً في الأغنام المصابة بالبروسيلات و الملقحة بلقاح Rev1 . رسالة ماجستير - أحياء مجهرية - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
- [9] Lowery, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- [10] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature (Lond.)*. 227: 680-685.
- [11] - الزبيدي ، إبراهيم عبد الحسين (٢٠٠٧). تحضير و تجربة مستضد مستخلص من بعض عتير البروسيلات للقاحية. رسالة دكتوراه - طب باطني وقائي - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
- [12] Banai, M.; Abramson, M.; Iern-Mayer., Chechik, K.; Hoida, G.; Zani, O.; Bardenstein, S.; Cogen, A. and Davidson, M. (1995). Problems associated with the persistence and possible horizontal transfer of *Br. melitensis*. CNEVA Alfort, France, PP: 69-76.
- [13] Kolar, J. (1995). Some experience from Brucellosis control with Rev1 vaccine in heavily infected country Mongolia. FAO/WHO/OIE round table on the use of Rev1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA, Alfort, France. PP 77[81].
- [14] Moreno, E.; Cloecktaet, A. and Moriyon. (2002). *Brucella* evaluation and Brucellosis in Human ,Sheep and Cattle populations in Kirikkale(Turkey). *Turk.J. Vet.Anim.Sci.* 31(1):75-78.
- [4] Heydari, F.; Mozaffari, N.A. and Tukmechi, A. (2008). Comparison of standard seroagglutination tests and ELISA for diagnosis of Brucellosis in West Azerbaijan Province, Iran. *Res. J. Biol. Sci.* 3:1460-1462.
- [5] Araj, G. F. and Awar, G. N. (1997). The value of ELISA vs. negative coombs findings in the sero - diagnosis of human brucellosis, sero diagnosis and immuno therapy. *Infectious diseases* 8: 169-172.
- [6] Rukkamsuk, T.; Karnjana mala, W.; Nuamjit, M.; Supa , P. Phokrasung, P. and Chakmongkol, S. (2008). A study on antibody against *Brucella melitensis* infection in meat goat. Proceeding, The 15<sup>th</sup> Congress of FAVA, FAVA-OIE Joint Symposium on Emerging Diseases. 27-30 .
- [7] FAO-Brucellosis (2003). International Research Conference including the 56<sup>th</sup> Brucellosis Research conference.
- [8] - صالح، حارث محمد سليم (١٩٩٩). التقييم المناعي

لتشخيص مرض السل باستخدام  
الفحوصات المناعية. رسالة  
ماجستير - أمراض مشتركة -  
كلية الطب البيطري - جامعة  
بغداد.

[17] Davis, B. D.; Dulbecco,  
R.; Eisen, H. N. and  
Ginsberg, H. S. (1990).  
"Microbiology",  
Lippincott, Philadelphia  
647-661.

taxonomy. Vet.  
Microbiol., 90: 209-227.  
[15] - حمزة، أسيل محمد. (2002).  
دراسة مقارنة لكفاءة البروسيلات  
المحضرة محلياً في الكشف عن  
مرض البروسيلات. رسالة  
ماجستير - أمراض مشتركة -  
كلية الطب البيطري - جامعة  
بغداد.  
[16] - شعلان، واثق عبد  
الجبار (2003). دراسة لتحضير  
بعض مستضدات عصيات السل

جدول (1) التركيز البروتيني للذرات المفصولة بطريقة الترشيح الهلامي .

كمية البروتين $\mu\text{g/ml}$	المستضد
317.4	الذرة الاولى
364.2	الذرة الثانية
108.4	الذرة الثالثة
329.4	الذرة الرابعة

جدول (2) التسلسل و الأوزان الجزيئية و أسماء البروتينات القياسية المعتمدة في الدراسة.

الوزن الجزيئي/دالتون	اسم البروتين القياسي	تسلسل البروتين
14700	Lysozyme	1
25300	Trypsin inhibitor	2
35000	Carbonic anhydrase	3
80000	Ovatransferin	4
150000	Gammaglobulin	5

جدول (٣) الاوزان الجزيئية للبروتينات و حسب تسلسل انفصال الحزم بعملية الترحيل الكهربائي لمستخد 1ve R.

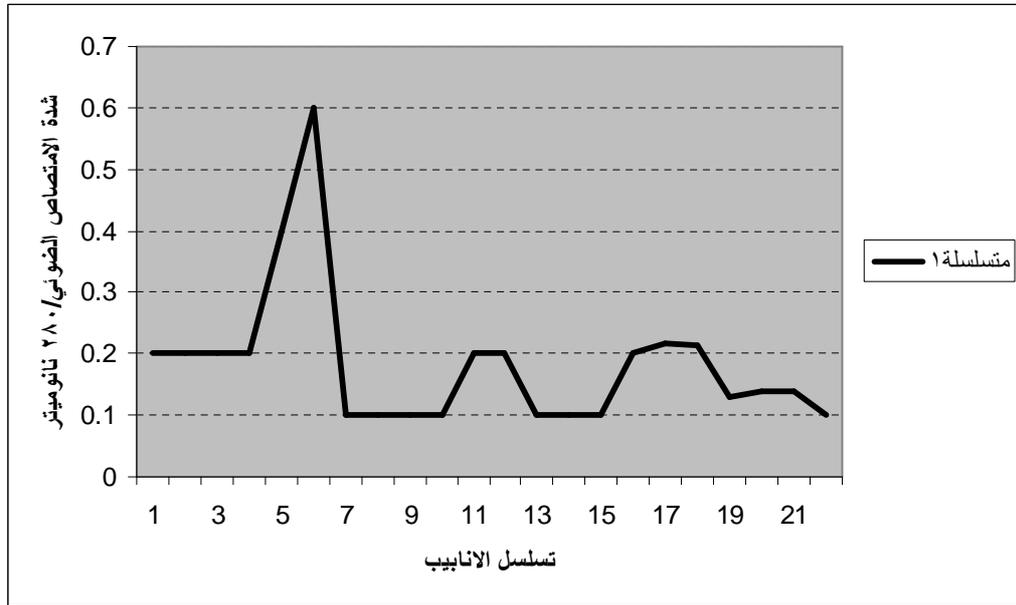
الوزن الجزيئي/دالتون	تسلسل البروتين
123026	A1
794320	A2
478630	A3

جدول (٤) نتائج المعدلات الحسابية لفحص الاليزا في الحيوانات المصابة بالبروسيلة المالطية.

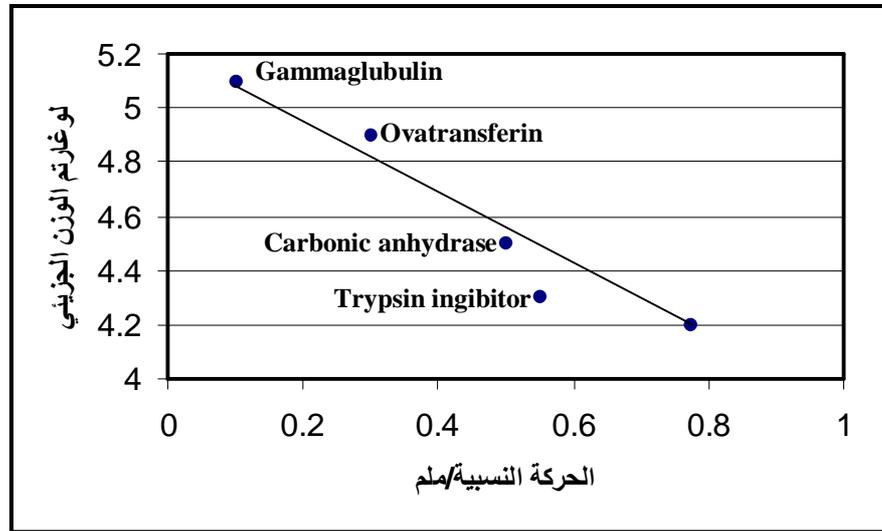
المعدل الحسابي للكثافة الضوئية/نانوميتر للحيوانات المصابة بالبروسيلة المالطية	المستخد المستخدم في فحص الاليزا
٤٨0.1	synbiotic شركة Kit
1.275	الذروة الاولى
2.069	الذروة الثانية
1.081	الذروة الثالثة
0.911	الذروة الرابعة

جدول (٥): نتائج المعدلات الحسابية لفحص الاليزا في الحيوانات المصابة بالبروسيلة المجهضة.

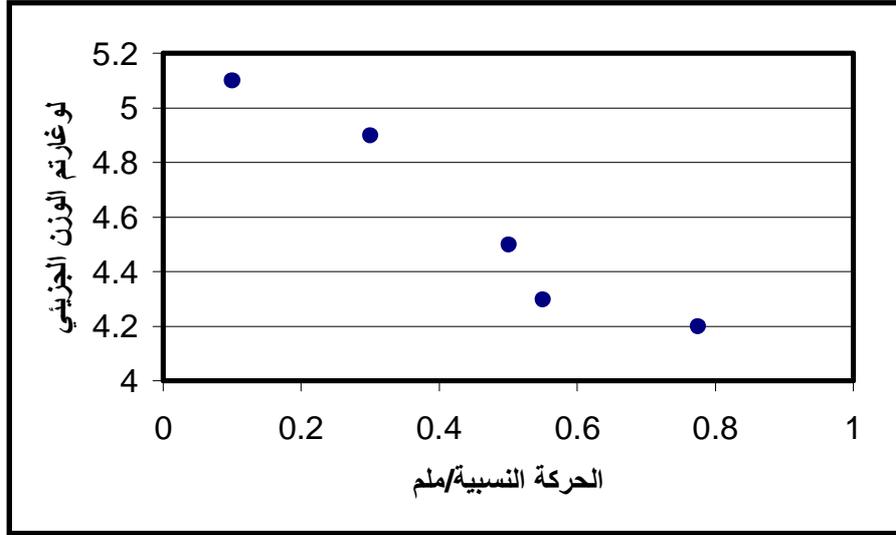
المعدل الحسابي للكثافة الضوئية/نانوميتر للحيوانات المصابة بالبروسيلة المجهضة	المستخد المستخدم في فحص الاليزا
1.386	synbiotic شركة Kit
1.125	الذروة الاولى
1.355	الذروة الثانية
1.545	الذروة الثالثة
1.104	الذروة الرابعة



شكل (١) نتيجة الترحيل بعملية الترشيح الهلامي لمستعد عترة Rev1 المحضر بطريقة التكسير بالامواج فوق الصوتية



شكل (٢) العلاقة البيانية بين لوغارتم الوزن الجزيئي مع الحركة النسبية للبروتينات القياسية.



شكل (٣): يبين العلاقة البيانية بين البروتينات القياسية (●) والمستضدات البروتينية العترة 1Rev المستخلص بطريقة التفسير بالأمواج فوق الصوتية (■).



شكل (٤): شكل و انفصال الحزم البروتينية لبروتينات المستضد العترة Rev1 المستخلص بطريقة التفسير بالأمواج فوق الصوتية (على اليسار) مقارنة مع البروتين القياسي (على اليمين).