انتاج بروسلين خاص للكشف عن مرض البروسيلوسز

*أسيل محمد حمزة **

استلام البحث 17،كانون الاول ، 2009
قبول النشر 5، حزيران، 2012

الخلاصة:

حُضـّرمستأرج سـايتوبلازمي ذائـب (بروسـلين) مـن جرثومـة البروسـيلا المالطيـةRev1 و اسـتعمل لتشخيص الاصابة في الفئران المصابة تجريبيا بالبروسيلا الماطية و المجهضة الضاريتين بعد مرور اسبوعين من الاصابة و سجلت القمة الثالثة للمستخلصات الاربعة المفصولة بطريقة الترشيح الهلامي اعلى استجابة جلدية من اربع قمم. تم استعمال مجموعة من الفئران المختبرية منعت بعترة S19 اللقاحية وبعد مرور اسبوعين استعملت المستأرجات المستخلصة بوصفها فحص حساسية جلدي و سجلت القمة الثالثة اعلى استجابة جلدية ،كما منعت مجموعة من الفئران المختبرية بالليستيريا الحية المضعفة وبعد مرور اسبوعين من التمنيع ُأجري فحص الحساسية الجلدي لكلتا المجموعتين بالبروسلينات السايتوبلازمية ولم تعطِ جميع القمم نتائج موجبة لفحص الحساسية الجلدي.

الكلمات المفتاحية : انتاج ، بروسلين،بروسيلا، فحص الحساسية الجلدي.

المقدمة:

هنالك العديد من المحاولات المحلية و العالمية لانتـاج بروسـلين مرجعـي عملـي يخـدم تشـخيص مرض (البرسيللوسز) الذي يعد من اهم الامراض المشـتركة التـي تصـيب الانسـان و الحيـوان علـى السواء [1] ،صنفت منظمة الصحة العالمية مرض البروسـيلا ضـمن المجموعـة الثالثـة للامـراض الخطرة[2] أذ انه واسع الانتشار في وسط وشرق البحـر الابـيض المتوسـطوكذلك فـي المنـاطق الاسـتوائية و شـبه الاسـتوائية [3،4،5]. ان الفحوصات المحلية المعتمدة على المعيار الحجمي للاجسـام المضـادة لاتسـتطيع ان تفـرق مـابين الاصـابة الحـادة اوالمزمنـة فضـلاً عـن صـعوبة تطبيقهـا فـي المسـحوحات الوبائيـة [6] و حصـول نتـائج موجبـة كاذبـة بسـبب العلاقـة المستضـدية بـين جرثومـة البروسـيلا و جـراثيم اخـرى [7,8,9,10,11] يعد فحص الحساسية الجلدي من الفحوصـات الشـائعة الاسـتعمال لتشـخيص مـرض البروسيللوسـزأذ حُضـّرت بروسـلينات مـن انـواع مختلفة من جنس البروسيلا منهم من استعمل العترة المالطية الضارية واخرمن استعمل العترة المالطية اللقاحيـة Rev1 فيمـا اسـتعملت عتـرة البروسـيلا المجهضـة اللقاحيـة [12,13,14] ،فضـلا عـن أن البروسـلينات المنتجـة فـي الـ*INRA تواجـه الكثيرمن الانتقادات ،ولعدم وجود بروسلين مرجعي يمكـن الركـون اليـه لهـذه التقنيـة المهمـة ولوجـود دراسات متعددة و نتائج متناقضة وبعض التوصيات بأعتمـاد البروسـلينات فـي الكشـف عـن المـرض فقدهدفت الدراسة الحالية الى انتاج بروسلين سـايتوبلازمي خـاص للكشـف عـن البروسـيلا دون الجراثيم الاخرى فقط .

INRA* Institute National d' la Recherché Agronomique

المواد وطرائق العمل:

1. تحضير المستضد

حُضّـر المستضـد بأسـتعمال عتـرة Rev1 ببحسـب طريقة الباحثه [14] بطريقة التكسير بالامواج فوق الصوتية وبعد اجراء النبذ المركزي اهمل السائل الطافي .

2. فصـل البروتينـات بطريقـة الترشـيح الهلامـي الكروموتـــــوكرافي Column chromatography

استعُمل في هذه التجربة عمود ذو ابعاد x2.5100 ملم ثم أستُعمل هلام نوع (sephacryl S- 200) أذ كان معدل الفصل لكل انبوب 5 مل و بمعدل 35 انبوباً ثم ثبتت سرعة مرور المحلول داخل العمود بمعـدل 20-21 مـل بالسـاعة بعـد ذلـك تـم قـراءة الامتصاص الضوئي بجهاز قياس شدة الامتصـاص الضوئي و بطول موجي قدره 280 نـانوميتر و تـم رسـم اشـكال القمـم او الـذروات التـي تمثـل قـيم الامتصـاص الضـوئي التي اعطتها كل انبوبـة ثم تم جمع سائل الانابيب الحاوية على تركيـز عال من البـروتين فـي كل ذروة لقيـــاس نسـبة البروتين فيـها بطريقة لوري [15].

* وحدة الامراض المشتركة /كلية الطب البيطري جامعة بغداد

3. حيوانات التجربة

استعملت فئران مختبرية تراوحت اوزانها بين 25-30 غم للحيوان الواحد و قسمت الى ست مجاميع على النحو الاتي:

مجموعة الاصابة : قسمت الى مجموعتين أذ ضمت كل مجموعة 5 حيوانات من الفئران المختبرية و من كلا الجنسين أذ اصيبت المجموعة الاولى بعترة البروسيلا المالطية وبجرعة اصابة 1 10^6x /0.1 مل تحت الخلب فيما اصيبت المجموعة الثانية بعترة البروسيلا المجهضة و بجرعة اصابة 1 10^6x /0.1 مل تحت الخلب و بعد مرور اسبوعين من الاصابة أجري فحص الحساسية الجلدي بعد ذلك قتلت حيوانات التجربة وزرعت الاعضاء .

مجموعة التمنيع : قسمت الى مجموعتين

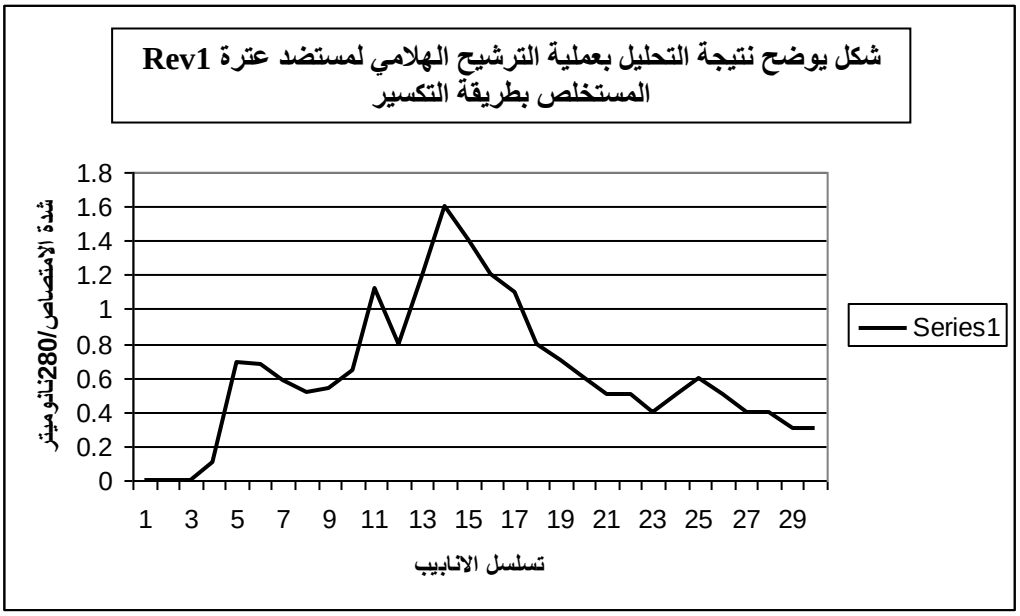
1. مجموعة حقنت بمستضد عترة S19 بجرعة1× 10^6 /0.1 مل تحت الجلد وبعد مرور شهر اعطيت الحيوانات جرعة منشطة وأُجري فحص الحساسية الجلدي لكل قمة بعد مرور اسبوعين من الجرعة المنشطة .
2. مجموعة حقنت بمستضد *Listeria monocytogenes* حي مضعف بجرعة 15×10^7 Cfu/ml بحسب طريقة الباحثة [16].

مجموعة السيطرة : ضمت 5 حيوانات تم حقنها بدارئ الفوسفات الملحي بجرعة 0.1 مل تحت الجلد لكل حيوان و اعيدت الجرعة بعد مرور اسبوعين .

النتائج:

1. نتائج الترشيح الهلامي

أظهرت نتائج الترشيح الهلامي بأستعمال هلام السيفاكرل sephacryl S200 وجود اربع ذروات في المستضد المحضر بطريقة التكسير بالامواج فوق الصوتية من العترة اللقاحية Rev1 كما في الشكل [1].



شكل [1] يوضح نتيجة التحليل بعملية الترشيح الهلامي لمستضد العترة Rev1المستخلص بطريقة التكسير بالامواج فوق الصوتية.

2. قياس تركيز البروتين في الذروات

تم حساب البروتين في المستخلص الخام و في الاجزاء المفصولة بحسب طريقة [15] و بطول موجي 280 nm أذ استخرجت الكثافة الضوئية لكل انبوب أذ ان اعلى تركيز بروتيني كان في المستضد الخام ثم القمة الثالثة والرابعة يليها الثانية ثم الاولى كما في جدول [1].

جدول[1] يوضح تركيز البروتين في المستضد الخام و ذرواته المختلفة .

المستضد	الخام	M1	M2	M3	M4
تركيز البروتين مايكوغرام/مل					
	3943	317.4	364.2	858.4	409.2

3. عقامة المستضدات من التلوث البكتيري

لم تظهر المستضدات المستخلصة اي تلوث عند زرعها على الاوساط الزرعية المختلفة.

4. نتائج فحص الحساسية الجلدي

أظهرت المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي اعلى النتائج للقمة الثالثة في الفئران المصابة بالبروسيلا المالطية الضارية كذلك سجلت اعلى النتائج للقمة الثالثة في الفئران المصابة بالبروسيلا المجهضة الضارية كما في الجدول[2]

جدول [2] يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي بالقمم المفصولة في الفئران المصابة بالبروسيلا المالطية و المجهضة الضاريتين.

نوع الاصابة	اداة فحص الحساسية الجلدي	المعدلات الحسابية	
		فرق التثخن بعد24 ساعة	فرق التثخن بعد48 ساعة
البروسيلا المالطية الضارية	M1	1.30	0.91
البروسيلا المالطية الضارية	M2	1.02	0.84
البروسيلا المالطية الضارية	M3	2.98	1.84
البروسيلا المالطية الضارية	M4	1.62	0.88
البروسيلا المجهضة الضارية	M1	1.26	0.91
البروسيلا المجهضة الضارية	M2	1.01	0.79
البروسيلا المجهضة الضارية	M3	2.43	1.22
البروسيلا المجهضة الضارية	M4	1.54	0.81

اظهرت المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي اعلى النتائج للقمة الثالثة في الفئران الممنعة بالبروسيلا اللقاحية S19 كما في الجدول[3]

جدول [3] يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي بالقمم المفصولة في الحيوانات الممنعة بعترةS19.

نوع التمنيع	اداة فحص الحساسية الجلدي	المعدلات الحسابية	
		فرق التثخن بعد24 ساعة	فرق التثخن بعد48 ساعة
S19	M1	1.21	0.82
S19	M2	1.04	0.91
S19	M3	2.78	1.44
S19	M4	1.49	0.42

فيما اظهرت المعدلات الحسابية للحيوانات الممنعة بالليستيريا مونوسايتوجينس نتائج مقاربة لمجموعة السيطرة كما في جدول[4].

جدول [4] يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي بالحيوانات الممنعة بالليستيريا .

نوع التمنيع	**اداة فحص الحساسية الجلدي**	**المعدلات الحسابية**	
		فرق التثخن بعد24 ساعة	**فرق التثخن بعد48 ساعة**
*L.monocytogens*حي مضعف	M1	0.12	0
*L.monocytogens*حي مضعف	M2	0.12	0
*L.monocytogens*حي مضعف	M3	0.12	0
*L.monocytogens*حي مضعف	M4	0.12	0

المناقشة:

استعملت العترة اللقاحية (Rev1) *Brucella melitensis* لتحضير البروسلين السايتوبلازمي كونها من اكثر العتر امتلاكا للمستضدات المتشابهة مع العتر اللقاحية الاخرى [17] اذ استعملت بوصفها لقاح للابقار و اعطت استجابة مناعية جيدة ضد جرعة التحدي بالعترة الضارية لجرثومة البروسيلا المالطية في الابقار[19,18].حضر بروسلين سايتوبلازمي كونه ذا فائدة تشخيصية اذ اشار[20] الى أن جميع الفحوصات السيرولوجية تنتج عنها اجسام مضادة لمستضد متعدد السكريد الشحمي اما المستضدات الداخلية و أغلبها سايتوبلازمية فلا تظهر ضدَها اجسام مضادة الا في حالة استعمال البروتينات الداخلية فقط دون جدار الخلية .أظهرت النتائج عند تحليل مستضد العترة Rev1 بطريقة الترشيح الهلامي وجود اربع ذروات بروتينية وهي تتوافق مع الباحث[17] عند استعماله الفينول في طريقة التحضير ولا تتفق معه عند استعماله لحامض الخليك ثلاثي الكلور في طريقة الاستخلاص وقد يعود السبب في ذلك الى اختلاف طريقة التحضير.بينت النتائج ان المحتوى البروتيني العالي للمستضد الخام و المستضدات المستخلصة بطريقة الترشيح الهلامي هي اكثر بكثير من نتائج الباحث [17] وقد يعود السبب في ذلك الى انه أستُعمل طريقة استخلاص البروتين بطريقة الترسيب بحامض الخليك ثلاثي الكلور و الترسيب بالفينول مما يؤدي الى اهمال اجزاء بروتينية من الجرثومة بينما لايحدث ذلك في عملية التكسير المستعملة في هذه الدراسة[14] .سجلت نتائج فحص الحساسية الجلدية تفوق المعدلات الحسابية لمجموعة الاصابة عن مجموعة التمنيع ولاسيما مجموعة الاصابة بعترة البروسيلا المالطية الضارية وقد يعود السبب الى أمرين احدهم التركيب المعقد لبروتينات هذا المستضد أذ هنالك 9 بروتينات مشتركة بين جرثومتي البروسيلا المالطية و المجهضة [21] اونتيجة استعمال العترة الناعمة اذ تسبب استجابة جلدية عالية [22،23] اما

اعلى استجابة جلدية للقمة الثالثة فيعود ذلك الى امتلاكه التراكيب البروتينية المشتركة و الفعالة في احداث الاستجابة بسبب احتواء هذه القمة على تركيز بروتيني اعلى من باقي القمم [24] ان التفاعل الجلدي يعتمد على تركيب المدورات الخلوية الناتجة من حقن المستضد و هذه بدورها لها علاقة وطيدة مع تركيز وفعالية المستضدات المستعملة [25] و ومن ثم يمكن فهم الاختلاف في شدة التفاعل الجلدي لكل مستضد عن غيره.

اظهرت النتائج عدم حصول استجابة جلدية للحيوانات المختبرية الممنعة بالليستريا عند استعمال البروسلين السايتوبلازمي وهذا لا يتفق مع ماحققته الباحثة [16] ويعود السبب في ذلك الى ان المستضدات الداخلية السايتوبلازمية لا تظهر ضدَها استجابة جلدية الا في حالة استعمال البروتينات الداخلية الخاصة لكل جرثومة من دون الجراثيم الاخرى و نستنتج من ذلك ان المستضدات الداخلية (السايتوبلازمية) هي مستضدات خاصة لكل نوع .

المصادر:

1. FAO-Brucellosis 2003 International Research Conference including the 56th Brucellosis Research conference.

2. OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition ,2004 part 2,section 2.3 , chapter 2.3.1.

3. Benkirane ,A2006 Ovine and caprine brucellosis: World distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. Small Ruminant Research, 62, 19–25.

4. Bronsvoort, B.M., Koterwas, B., Land, F., Handel I.G., Tucker, J., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Abdoel, T.H., Smits, H.L 2009 mparison of a flow assay for brucellosis antibodies with the reference cELISA test in west African Bos indicus. PLoS one (open access). 4, e5221: 1–7.

5. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V2006 The new global map of human brucellosis. Lancet Infect.Dis. 6, 91–99.

6. McGiven, J.A., Thompson, I.J., Commander, N.J., Stack, J.A. 2009Time-resolved fluorescent resonance energy transfer assay forsimple and rapid detection of anti-Brucella antibodies in ruminant serum samples. J. Clin. Microbiol., 47, 3098–3107

7. Corbel,M.J 1985 Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological cross-reaction . Review article.Vet.Bull.55:927-942.

8. Carrica,M.C.; Craig,P.O.; García-Angulo,V.A.; Aguirre,A.; García-scovi,E.; Goldbaum,F.A. and Cravero,S.L 2011 YqiC of Salmonella enterica serovar Typhimurium is a membrane fusogenic protein required for mice colonization BMC Microbiology 2011, 11:95-105.

9. Carrica Mdel C, Craig PO, Alonso Sdel V, Goldbaum FA, Cravero SL 2008 Brucella abortus MFP: a trimeric coiled-coil protein with membrane fusogenic activity. Biochemistry, 47:8165-8175.

10. Celli J 2006 Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. Res Microbiol 2006, 157:93-98.

11. Bakowski MA, Cirulis JT, Brown NF, Finlay BB, Brumell JH 2007 SopD acts cooperatively with SopB during Salmonella enterica serovar Typhimurium invasion. Cell Microbiol 2007, 9:2839-2855.

12. خليفة ، خليفة احمد، العامري ، ثامر عبد علي .، جرجيس ، جليل ابراهيم .1999 . مرض البروسيلا: التشخيص بالبروسلين . المجلة العراقية للعلوم ، المجلد 40 ب ، العدد 1،ملقى في مؤتمر الطب البيطري العربي السادس /1993.

13. صالح، حارث محمد سليم .1999 . التقييم المناعي للبروسلينات المنتجة محلياً في الاغنام المصابة بالبروسيلا و الملقحة بلقاح Rev1 . رسالة ماجستير- أحياء مجهرية – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.

14. حمزة، اسيل محمد. 2002 دراسة مقارنة لكفاءة البروسلينات المحضرة محلياً في الكشف عن مرض البروسيلوسينر. رسالة ماجستير – امراض مشتركة – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.

15. Lowery, O.H.; Rosebrough, N, J.; Farr, A.L. and Randall, R.J 1951 Protein measurement with the follin

phenol reagent .J.Biol.Chem.193:265-275.

16. الجبوري ، نغم محمد عيَال . 2002 . تأثير التمنيع بالليستيريا مونوسايتوجينس على مرضية الجراثيم داخل خلوية اخرى.رسالة ماجستير- امراض مشتركة-كلية الطب البيطري.

17. الزبيدي ، ابراهيم عبد الحسين .2007 . تحضير و تجربة مستضد مستخلص من بعض عتر البروسيلا اللقاحية. رسالة دكتوراة- طب باطني وقائي- كلية الطب البيطري-جامعة بغداد.

18. 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 Alford, France, PP: 69-76.

19. 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, Alford, France. PP 77-81.

20.Plommet,M1995 Live vaccine : virulence,immunogenicity , protection & safety :Historical ,theoretical & practical considerations applied to *Brucella melitensis* (Rev1) vaccine FAO/WHO/OIE round table on the use of Rev1 vaccine in small ruminants and cattle .CNEVA Alford, France.pp:7-18.

21. Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N. and Ginsberg, H. S. 1990. "Microbiology", Lippincott, Philadelphia 647-661.

22. Bercovich, Z. 2000 The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: A review>Vet.Quart.22:123-130.

23.Cheville,N.F..;Jensen,A.E.;Morfitt,D. C. and Stable,T.J1994 Cutaneaous delayed hypersensitivity reaction of cattle vaccinated with mutant strain of *Brucella abortus* , using brucellosis prepared from various Brucella strains.Am.J.Vet.Res.55(a):1261-1266.

24. الزبيدي ،أبراهيم عبد الحسين.، حمزة، أسيل محمد و خلف ، جنان محمود 2010.تحضير عدة اليزا للكشف عن الاصابة بالبروسيلا. مجلة الهندسة و التكنولوجيا المجلد 28 العدد 13 .618-626 .

25. حمزة ، أسيل محمد 2010 محاولة انتاج لقاح امين لمرض البروسيللوسز.مجلة الانبار للعلوم البيطرية . المجلد [1] العدد[3] . 10-17.

Production of specific brucellin to diagnose Brucellosis

Aseel M. Hamzah*

*Zoonotic disease unit Vet. Med.-Baghdad University

Abstract :

A soluble cytoplasmic antigen (Brucellin) was prepared from *Brucella melitensis* Rev1 and used to diagnose brucellosis in experimentally infected mice with virulent strains of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* two weeks after infection. The best result was obtained with the third peak of the four peaks. All four peaks were used as antigen for skin test in a group of mice two weeks after vaccinated with S19 vaccine and the best result was obtained with third peak. All four peaks were also used as antigen for skin test in a group of mice previously vaccinated with *Listeria monocytogenes* live attenuated vaccine. All four fractions of the extracted brucellin antigens exhibited a negative skin test result in *Listeria monocytogenes* experimentally vaccinated mice.