Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

5Contemporary International Scientific Forum
for Educational, Social, Human, Administrative and Natural Sciences
"Present Vs Future Outlook"

الملتقى العلمي الدولي المعاصر
للعلوم التربوية والاجتماعية والانسانية والادارية والطبيعية

"نظرة بين الحاضر والمستقبل
30 - 31 ديسمبر –2019 - اسطنبول – تركيا
http://kmshare.net/isac2019/

Using some Immunological Tests to assure identification of *Plesiomonas shigelloides* isolated from water

Yousra Yahya Agha [a] , Amera Mahmood Al Rawi [b]

[ab] College of Sciences /Department of Biology / University f Mosul

[a] hananagha63@yahoo.com

[b] Umnashwa@yahoo.com

Abstract: The present study was included performance of some immunological tests to assure identification of Plesiomonas shigelloides 5 isolates were used detecting from 50 samples collected from sewage water, while we cannot obtain any isolate of this bacterium from 50 drinking water samples. Direct agglutination test, Haemagglutination test and ELISA test were performed; the results showed the ability of bacterial isolates to agglutinate directly while it cannot agglutinate sheep RBC and the ELISA test gave positive result to assure identification of this bacterium as most fast and accurate results.

Keywords: haemagglutination, ELISA, Plesiomonas sigelloides

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

استخدام بعض الاختبارات المناعية لتأكيد تشخيص جرثومة *Plesiomonas shigelloides* المعزولة من المياه

يسرى يحيى آغا **د.أميرة محمود الراوي**

كلية العلوم/قسم علوم الحياة/جامعة الموصل

الملخص

شملت الدراسة الحالية اعتماد بعض الاختبارات المناعية لتأكيد تشخيص جرثومة *Plesiomonas shigelloides* حيث استخدمت (5) عزلات من الجرثومة تم الحصول عليها من 50 عينة مياه مجاري , فيما لم يتم الحصول على اية عزلة للجرثومة من عينات مياه الشرب البالغة 50 عينة . اجريت اختبارات التلازن المباشر Direct agglutination والتلازن الدموي Haemagglutination واختبار الاليزا ELISA test وأوضحت النتائج قدرة عزلات جرثومة *P. shigelloides* على احداث التلازن المباشر وعدم قدرتها على إحداث تلازن كريات الدم الحمر للأغنام فيما ابدى اختبار الاليزا نتيجة موجبة في تأكيد تشخيص الجرثومة وإعطاء نتائج سريعة ودقيقة.

المقدمة

تستخدم التفاعلات المناعية كطرق للتحري عن الممرضات كونها تعطي مستويات عالية من الخصوصية والحساسية المناعية ومنها اختبار التلازن المباشر الذي يعرف بانه تكوين المعقد المناعي الناتج من ارتباط خلايا او اجسام مع الاضداد الخاصة بها وعادة يوضح تفاعل التلازن بحصول تكتلات او تجمعات ترى بالعين المجردة والتي تفيد في تشخيص حالات مرضية عديدة اضافة الى اختبار التلازن الدموي Haemagglutination test الذي يعرف على انه ارتباط الاضداد مع المستضدات السطحية على كريات الدم الحمراء الذي يعد كخطوة اولى لالتصاق الجرثومة واستعمارها للمضيف . ان اول

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

من وضع اسس اختبار التلازن الدموي العالم Hirst عام 1941 وخاصية التلازن الدموي تتميز بها العديد من الكائنات المجهرية وذلك بقابليتها على الالتصاق على سطح كريتي دم حمراء في آن واحد وعادة يجري الاختبار اما باستخدام الانابيب او باستخدام صفيحة البولي ستيرين حيث يتكون في قعر حفر الصفيحة شبكة من كريات الدم الحمراء (Gerald et al., 1996)

ويعد اختبار الاليزا من الاختبارات المناعية السريعة والحساسة لقياس الاجسام المضادة في مصل المصابين لغرض سرعة التشخيص وقد وصف الاليزا لاول مرة من قبل Engvall و Perlmann عام 1971 ثم من قبل Schuurs وVan weemen عام 1977 وهو يوفر طريقة سهلة وامينة لقياس المستضد من الكمية الكلية للامينوكلوبيولين حيث صنفت الاليزا ضمن طرق الامتصاص المناعي الغير متجانس Heterogeneous immunosorbent assays والتي فيها .

- الجزء المرتبط والحر من الامينوكلوبيولين (الروابط) يفصل فيزياوياً بعملية الغسل .
- الضد Ig المطلوب قياسه يكون مرتبط اما مباشرة او بطرق غير مباشرة مع الطور الصلب .

هناك انواع مختلفة للاليزا تم تطويرها الا ان الطرق الشائعة الاستعمال يمكن تقسيمها الى مجاميع مختلفة اعتماداً على الاسس التالية :

- العامل المراد الكشف عنه او الكمية المراد تحديدها سواءاً كانت مستضد او ضد متخصص او الاليزا النوعية او الكمية .
- تحضير طريقة القياس بشكل مباشر ، غير مباشر (الساندويج) او طرق قياس اخرى (Amplified assays) .
- طبيعة المادة الاساس المستخدمة (الملونة) .

كمية المواد المتفاعلة المستخدمة مثل ماكروااليزا (Macro-ELISA) تجري بالانابيب والمايكروااليزا (Micro-ELISA) او باستخدام طبق المقياس الدقيق (Mirco-ELISA) .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

المواد وطرائق العمل

تحضير المستضدات :

تم تحضير المستضد السوطي H antigen والجسمي O antigen اعتماداً على طريقة (Finegold,1978).

تحضير المصل المضاد Preparation of antisera

لتحضير المصل المضاد تم حقن (4) أرانب نيوزلندية بيضاء من نوع Albino بعمر (6-8) شهر وبوزن (1.5-2) كغم بواقع مكررين لكل من المستضد الجسمي O والمستضد السوطي H المحُضّرين في الفقرة السابقة . حيث حقنت الأرانب عن طريق الوريد الاذني intravenous وحسب جدول الحقن ابتداءً بـ 0.5 سم3 من المستضد الى 2 سم3 منه، ثم تركت الارانب بعد اخر حقنة مدة سبعة ايام ، جمع بعدها الدم من الارانب وبضمنها ارنب السيطرة بطريقة طعنة القلب ، فصل المصل وحفظ حتى يحين اجراء الاختبار بدرجة حرارة 20-م (Finegold , 1978).

تحضير المعلق البكتيري Preparation of Bacterial Suspention

تم تلقيح الجرثومة في وسط IBG وحُضّن في ظروف مثالية للنمو ، جُمِعَتْ الخلايا باستخدام الطرد المركزي 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ، ثم غسلت بمحلول الفوسفات المنظم باس هيدروجيني 7.0 ، ثم حُضّر المعلق الجرثومي بتركيز 910 خلية/سم3 باستخدام طريقة العد بالاطباق .

التحري عن الاجسام المضادة لمستضد جرثومة *P. shigelloides* باستخدام التلازن بطريقة الشريحة

- تم تحضير كل من مستضد O ومستضد H للجرثومة كما في الفقرة من الاختبارات المناعية .
- تم اخذ 50 مايكروليتر من محلول المستضد O ووضع على شريحة زجاجية نظيفة كما وضع 50 مايكروليتر من محلول الفوسفات المنظم على الشريحة كاختبار سيطرة.
- اضيف 50 مايكروليتر من المصل المفصول من الارنب المصاب وارنب عينة السيطرة كلا على إنفراد .
- مزج المصل مع محلول المستضد ومع محلول السيطرة .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

- رُجّت الشريحة لمدة 2-3 دقيقة ، سجلت النتيجة الموجبة بدلالة حدوث تلازن وعدم ظهور التلازن يدل على سلبية الاختبار .
- كررت نفس العملية بالنسبة للمستضد H .

التلازن الدموي Haemagglutination

أُجري الاختبار اعتماداً على (Carvalho & Teixeria , 1995 ; Styriak et al ., 1999 ; Elsner et al ., 2000) . تم جمع عينات من مجاميع دم الانسان بأصنافه الاربعة A , B , O , AB إضافة الى عينة دم اغنام في انابيب اختبار معقمة ، أجري غسل لكريات الدم الحمراء بمحلول الفوسفات المنظم ثم علقت به وبتركيز (1 % حجم/حجم) ، أضيف 50 مايكروليتر من محلول الفوسفات المنظم لكل حفرة في صفيحة البولي ستيرين .

أجريت سلسلة من التخافيف المضاعفة Two fold serial dilutions للمعلق الجرثومي لغرض الحصول على حجم نهائي مقداره 50 مايكروليتر/حفرة ، اضيف 50 مايكروليتر من معلق كريات الدم الحمر للانواع المُحضّرة اعلاه الى جميع الحفر فضلاً عن ذلك أجري اختبار السيطرة بإضافة 50 مايكروليتر من محلول الفوسفات المنظم الى حفر السيطرة مع 50 مايكروليتر من معلق كريات الدم الحمر دون إضافة المعلق الجرثومي ، رُجّت الصفيحة رجاً خفيفاً لمدة دقيقة واحدة ، حُضّنت بدرجة حرارة 37 م وبعد مرور ساعتين سُجّلت النتائج بعد الاختبار بشكل موجب عندما تكون كريات الدم الحمر متلازنة على شكل شبكة كاملة تملأ قاعدة الحفرة ، اما النتيجة السالبة فتكون بترسيب كريات الدم الحمر في قعر الحفرة على شكل بقعة منتظمة الحواف .

المحاليل والمواد الخاصة باختبار اليزا

اولاً : المحضرة في المختبر

دارئ الكاربونيت (0.05), دارئ ملح الفوسفيت الفسيولوجي (PBS) , محلول الغسل (PBS-TT) , محلول مثبت المستضد (5%) , محلول مخفف المصل BSA + 0.05 % TT) (PBS (1%) , محلول ايقاف التفاعل. (Steinhoff et al., 1980 ; Mannig & Chen , 1980 ; Budavari et al., 1989 ; Salinas-Carmona et al., 1993; Ostyn et al., 1997) .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

ثانيا : المحاليل مُحضّرة تجارياً

المحلول المقترن بالانزيم المركز , المادة الصبغية , محلول المادة الاساس , المحلول المقترن بالانزيم المخفف

اختبار اليزا

تحضير الصفيحة

تم اجراء اختبار اليزا بالاعتماد على طريقة (WHO , 1976) حيث تم اولاً تحضير

صفيحة البولي ستيرين وحفظت الصفيحة المحملة بالمستضد بدرجة حرارة 4 م لحين الاستخدام

1-اضيف 200 مايكروليتر من المصل المضاد المُحضّر في الارانب بعد ان تم تخفيفه بنسبة (1 : 500) بمحلول مخفف المصل الى كل حفرة محملة بالمستضد مع مراعاة ترك ثلاث حفر :

الحفرة الأولى – تبقى فارغة دون إضافة ككفء Blank .

الحفرة الثانية – أضيف إليها 200 مايكروليتر من المصل الموجب (دون تخفيف).

الحفرة الثالثة – أضيف إليها 200 مايكروليتر من المصل السالب (دون تخفيف).

2-تم تغطية الصفيحة ، وحُضّنت لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 م .

3-غسلت الصفيحة بمحلول الغسل ثلاث مرات ، وقلبت على ورق ترشيح لإزالة المحلول.

4-أضيف 100 مايكروليتر من المحلول المقترن بالأنزيم المخفف لكل حفرة محملة بالمستضد الذي حُضّر بمزج 12 سم3 من محلول مخفف المقترن بالأنزيم مع 240 مايكروليتراً من المقترن بالأنزيم المركز .

5-حُضّنت الصفيحة المغطاة لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 م .

6-أضيف 100 مايكروليتر من المادة الاساس للانزيم الى كلّ حفرة الذي حُضّر من 12سم3 من محلول المادة الأساس مع 240 مايكروليتراً من محلول الصبغ المركز ، تركت الصفيحة في الظلام لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة .

7-أضيف 100 مايكروليتر من محلول حامض الكبريتيك المركز (N1).

8-قرئت النتيجة على طول موجي 450 نانوميتراً بجهاز المطياف الضوئي الخاص باختبار الاليزا (Organon Teknika-Belgeum) . تم تصفير الجهاز بحفرة الكفء.

9-تم حساب قيمة Cut-off value التي تعتبر الحد الفاصل بين النتائج الموجبة والسالبة اعتماداً على العلاقة

$$Cut - off = NCx + 0.300$$

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

حيث أن (NCx) تمثل معدل القراءة الامتصاصية للسيطرة السالبة Absorbance mean of negative control ، وكان تقييم النتائج كما يأتي :

الموجبة : قراءة الامتصاصية اكثر من قيمة Cut-off value .

السالبة : قراءة الامتصاصية اقل من قيمة Cut-off valu

النتائج والمناقشة

لقد ابدت كل من مستضدات جرثومة *P. shigelloides* HوO نتيجة ايجابية في اختبار التلازن المباشر بظهور شبكة ناتجة من اتحاد الاضداد مع مستضد الجرثومة وبالاعتماد على طريقة (Collins & Lyne , 1987) .

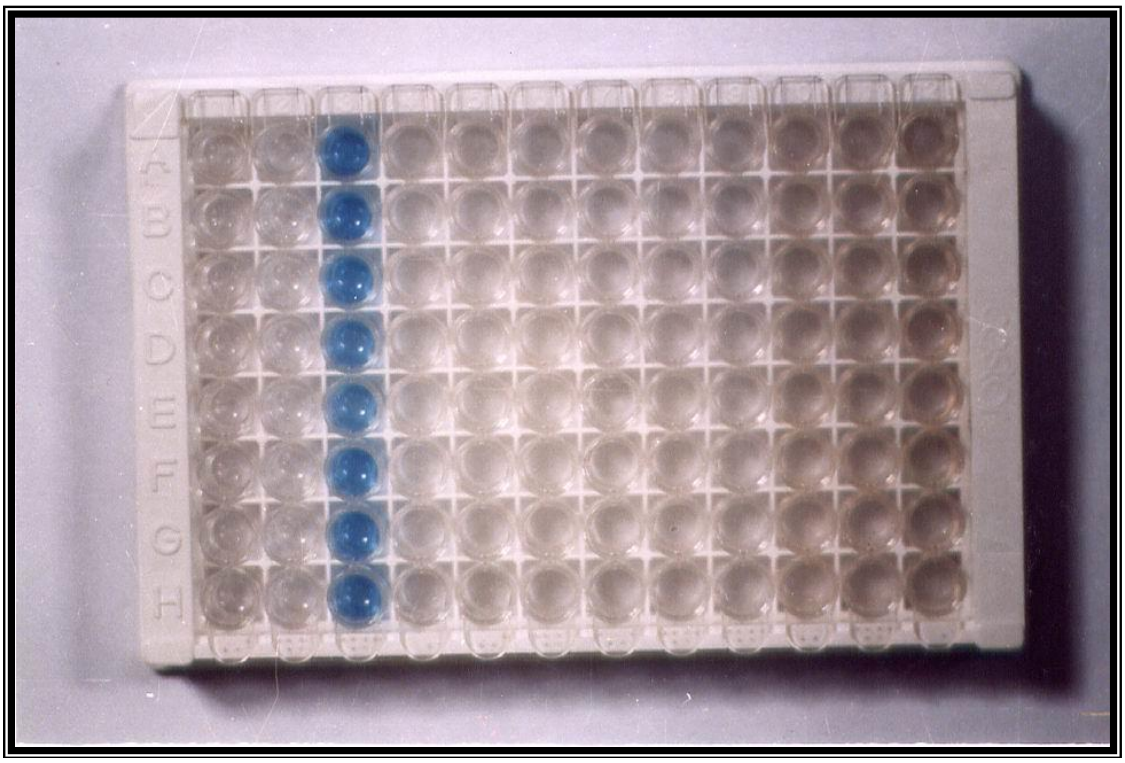
ومن خلال ملاحظة نتائج اختبار التلازن الدموي Haemagglutination test لوحظ عدم امكانية الجرثومة للالتصاق بكريات الدم الحمر للاغنام .والذي عادة تستخدم كريات الدم الحمراء للحيوانات (الاغنام) في الاختبار نتيجة لتوفرها وسهولة استخدامها إذ يمكن الاحتفاظ بها لفترة اسبوع الى اسبوعين بدرجة حرارة 4 م إضافة الى ان كريات الدم الحمراء للحيوانات ومنها الاغنام تُظهر عدداً كبيراً من البروتينات السكرية والدهون السكرية والتي يمكن الاستفادة منها في تشخيص العديد من السلالات الجرثومية (Clyen & Drumm , 1996) .

اما فيما يتعلق باختبار الاليزا فقد اظهرت نتائج الاختبار الموضحة في الصورة (1) النتيجة الموجبة بدلالة ظهور اللون الازرق في الحفر الحاوية على تخافيف مستضد الجرثومة وبقياس الامتصاصية عند طول موجي (450) نانوميتر اعطى المصل المضاد المخفف امتصاصية أعلى من قيمة الـ Cut-off value التي تمثل الفاصل بين النتائج الموجبة والسالبة المساوية (0.300) في حين بلغ معدل قراءة الامتصاصية للاختبار (0.389) دلالة على ايجابية الاختبار . وقد تم استخدام اختبار الاليزا للعديد من الجراثيم لمحاولة معرفة وتشخيص الاصابة بها فقد استخدم في حالة *V. cholera* باستخدام عدد من السلالات واكدت النتائج ايجابية الاختبار بدلالة ظهور اللون الازرق المخضر دلالة على امكانية انتاج الجرثومة للـ Enterotoxin المسبب لحالات الاصابة بها (Janda , 1998) .

وتتمثل اهمية اختبار اليزا في استخدامه في الدراسات الوبائية إذ يعد من الطرق التشخيصية الروتينية السهلة في التحري عن الاصابة الجرثومية كما ان الاختبار لايعتمد على الخزع النسيجية في التحري عن الاصابة وهذا يجنب المصاب عناء فحص

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

الناظور كما ان اختبار الاليزا تتمثل اهميته في التأكد من نجاح علاج الاصابة بالجراثيم . وعادة تستخدم طريقة الساندوج The double antibody sandwich assay لتحديد المستضد وتعتمد على ادمصاص adsorbent الاجسام المضادة على صفيحة البولي ستيرين Polystyrene اما الطريقة الغير مباشرة The indirect immunosorbent والتي تستخدم لتحديد الضد وتعتمد على ادمصاص المستضد على سطح حفرة البولي ستيرين (Elmer et al., 1997) .



الصورة (1) اختبار الاليزا

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

References : المراجع

Budavari , S.O. ; Neil , M.J. ; Smith , A. and Heckelman , P.E. (1989). "The Merck Index". Merck and Co., INC. , USA, 11th ed. pp1476.

Carvalho , M.G.S. and Teixeira , L.M. (1995). Haemagglutination proprties of Enterococcus. spp. Curr. Microbiol. 30 : 265-268 .

Clyne , M. and Drumm , D. (1996). Cell envelope characteristics of *Helicobacter pylori* : Their rol in adherence to mucosal surfaces and virulence . Immun. Med. Microbiol. 16 : 141-155.

Collins , C.H. and Lyne , P.M. (1987). "Microbiological Methods" 5th ed. Butteworths Co. U.K .

Elmer , W.K. ; Stephen , D.A. ; William , M.J. ; Paul , C.S. and Washington , C.W. (1997). "Diagnostic Microbiology". Lippincott-Raven , Philadelphia , New York , 15th ed. Chap. 6 , pp. 321-358.

Engvall , E. and Perlmann , P. (1971). Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8 : 871-874.

Finegold , S.M. ; Martin , W.J. and Scott , E.G. (1978). "Diagnostic Microbiology". 5th ed. Mosby Company. USA

Gerald , J.C. ; Barrie , P.M. ; Andrew , G.F. and Anthony , S. (1996). "Mackie McCartney : Practical Medical Microbiology". Churchil Livingstone USA , 14th ed. Chap. 24 , pp. 425-448.

Hirst , G.K. (1941). The Agglutination of Red Cells by Altantoic Fluid Chick Embryos Infected with Influenza Virus. Science. 94 : 22-25 .

Janda , J.M. (1998). Vibrio , Aeromonas and Plesiomonas . In. ; Collier , L, Balowsa , A. ; Sussman Meds. Topley and Wilson's . Microbiology and Microbial Infections. Systemic Bacteriology. Volume. 2. Arnold . 1065-1089.

Ostyn , A. ; Lanedle , M.A. and Tnovel , M.f. (1997). Glycolipid antigen for use in diagnostic assays for tuberculosis. Res. Microbiol. , 148 : 491-500.

Salinas-Carmona , M.C. ; Welch , O. and Casillas , S.M. (1993). Enzyme- Linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. J. Clin. Microbiol. , 31 : 2901-2906.

Schuurs , W.H.M. and Van Weemen , B.K. (1977). Enzyme immunoassay. Clin. Chem Acta 81 : 1-40.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Steinhoff , M.C. Hall , C.B. and Schnabel , K.C. (1980). Respiratory synctial virus serology by asimplified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol. 12 : 447-450.

Styriak , I. ; Laukova , A. ; Fallgren , C. and Wadslrom , T. (1999). Binding of selected extracellular matrix proteins to Enterococci and Streptococcus bovis of animal origin. Curr. Microbiol. 39 : 327-335.

World Health , Organization. (1976). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Genera , Switzerland : WHo, 54.