استخدام ا لصبغة ا لبديلة في تحضير مستضد ا ختبار ا لروزبنكال ا لمختص بداء البروسيلات

ارادة عبد ا لجبار سعيد* و سحر احمد البياتي*

*ا لمشروع ا لوطني للسيطرة على مرضي الاجهاض الساري و السل

**قسم المختبرات والبحوث البيطريه

ا لخلا صة

يعتبر اختبار الروز بنكال (Rose Bengal test) من ا لاختبارات ا لشائعة في تشخيص داء البروسيلات وخاصة في المسوحات الميدانية لغرض حصر الاصابة بالمرض في منطقة معينة. وقد استخدم عادة صبغة الروزبنكال القياسية المنتجة من قبل شركات متخصصة في تحضيرالمستضد الخاص بالاختبار التي تعطي اللون الوردي المعروف لامكانية رؤية التلازن الحاصل في الحالات الموجبة التفاعل مابين المستضد والاجسام المضادة الخاصة بجرثومة البروسيلا والمتواجدة في مصل الدم للنماذج المفحوصة للانسان ومختلف انواع الحيوانات.

استخدم في هذه الدراسة لتحضير مستضد الروزبنكال صبغة بد يلة متوفرة في الاسواق المحلية تستخدم في الصناعات الغذائية وبكلفة زهيدة جدا قياسا بكلفة الصبغة المستوردةالقياسية وقد تم اجراء كافة الفحوصات القياسية الخاصة بالصبغة ومن ضمنها اللون ودرجة الحموضة PH ودرجة ثبوتيتها Stability وقد تبين انها مطابقة لما في الصبغة المستوردة وقد تم متابعتها لحين انتهاء صلا حية المستضد .جرب المستضد المحضر بهذه الصبغة مقارنة مع المستضد المحضر بالصبغة المستوردة القياسية على عينات من مصل الدم للانسان ومختلف انواع الحيوانات وبينت النتائج عدم وجود اختلاف معنوي احصائيا عن المستضد المحضر بالصبغة المستوردة القياسية وهذا يعني امكانية استخدام الصبغة البديلة المستخدمة في الدراسة في انتاج مستضد الروزبنكال بدلا عن المستوردة وبالنتيجة الحصول على مستضد بكلفة اقل بكثير من كلفةالمستضد المنتج حاليا.

The Use Of Alternative Stain In Rose Bengal Test Antigen Preparation Which Specific For Brucellosis.

Erada A .J . Saeed[I] Sahar A. Al_Bayatti[II]

SUMMARY

The Rose Bengal test is one of the famous diagnostic test of Brucellosis specially as a screening test in order to detect the infection in limited area.

Rose Bengal standard stain which producd by specific companies was used in preparation of the test special antigen , The stain gives the known pink colour for the antigen during the test that make the agglutination in positive cases more visible due to the reaction between antigen and the specific antibodies of Brucella which found in the serum sample of human and different animals.

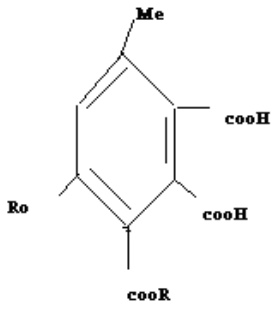
Antigen for the Rose Bengal test in this study is prepared by using alternative stain easily found in local supermarkets using for food colours and not expensive like standard stain. All standard tests were down for the stain like the colour ,pH, stability are same for two stains until the date of expire of antigen.

The antigen prepared with alternative stain was used in comparative with the antigen prepared with standard stain for testing serum samples of human and different animals, the results deal no significant different statistically between them that means as a result we can prepare antigen more easily and not expensive.

المقدمة

هناك العديد من الطرق المستخدمة لغرض تشخيص مرض البروسيلا مثل اختبار الروزبنكال والتلازن الانبوبي وتثبيت المتمم و اختبار الاليزا (ELISA) وتفاعل البلمرة (PCR) ولكن يبقى اختبار الروزبنكال هو من الاختبارات الشائعة الاستعمال بالتشخيص لغرض تحديد الاصابة وخاصة في المسوحات الميدانية لسهولة تطبيقه وسرعته في اعطاء النتائج بالاضافة الى كفائته ويجب ان يعاد فحص النماذج الموجبة باستعمال اختبار تثبيت المتمم (CFT) او اختبار الاليزا (ELISA) (3، 4، 11 ،12) ، يستخدم في اجراء الاختبار مستضد الروزبنكال الذي يمتاز بلونه الوردي نتيجة صبغ المستضد المحضر بالصبغة القياسية المستوردة والتي يمكن ارجاع تركيبها الكيمياوي الى Cochenilic acid الناتج عن اكسدة مادة monobromococcin

[I] National Project Of Controlling Brucellosis and T. B In IRAQ
[II] Veterinary Laboratory and Researches Department



Cochinillic acid

(C8H9O8.Br) الناتجة عن اضافة البرومين bromine في حلقة لحامض Kermesic acid وغليان حامض الخليك acetic acid (6).

تنتج هذه الصبغة القياسية من قبل شركات متخصصة قي تحضير المستضد الخاص باختبار ا لروزبنكال التي تعطي اللون الوردي المعروف لامكانية رؤية التلازن الحاصل في الحالات الموجبة التفاعل مابين المستضد والاجسام المضادة الخاصة بجرثومة البروسيلا والمتواجدة في مصل الدم للنماذج المفحوصة للانسان ومختلف انواع الحيوانات .

استخدم في هذه الدراسة لتحضير مستضد الروزبنكال صبغة بديلة متوفرة في الاسواق المحلية مستخدمة في الصناعات الغذائية وبكلفة زهيدة مقارنة مع الصبغة المستوردة ولاول مرة في العراق وهي صبغة امارنث Amaranth .وكان هدف البحث هو ايجاد صبغة بديلة متوفرة لاستخدامها بدون اي تغيير في المواصفات القياسية للمستضد .

المواد وطرق العمل

ارسل نموذج من الصبغة البديلة الى دائرة التقييس والسيطرة النوعية/ وزارة التخطيط وتم التعرف على اسم الصبغة ونوعها وقد تبين انها احد الاصباغ المستخدمة بالصناعات الغذائية والمسماة بصبغة امارانث Amaranth .

جربت الصبغة بثلاث تراكيز وذوبت بالماء المقطر وكان التركيز الاول وهو مايستخدم في تحضير الصبغة القياسية (3,7 غم /386مل) (3) اما الثاني كان ضعف التركيز الاول والثالث ثلاث اضعاف التركيزالاول ، وقد بينت النتائج بأن ثلاث اضعاف التركيز قد اعطى اللون المطابق للمستضد 11,1غم /386 مل, وبعدها تم اجراء كافة الفحوصات القياسية الخاصة بالصبغة لمعرفة مدى تشابهها مع الصبغة القياسية ومدى امكانية استخدامها كبديل ومن ضمنها اللون ودرجاته ودرجة الحموضة pH ودرجة ثبوتيتها (Stability) وقد تبين انها مطابقة لما في الصبغة المستوردة وقد تم متابعتها لحين انتهاء صلاحية المستضد كما مبين في جدول 1 .

حضر مستضد الروزبنكال في المشروع الوطني للبروسيلا والسل حسب طريقة (4،3) ومن العترة الناعمة Smooth للجرثومة Br .abortus بعد قتلها بالفينول والحرارة ، وقسم المستضد الى قسمين ومن ثم صبغ القسم الاول بصبغة الروزبنكال القياسية اما القسم الثاني صبغ بالصبغة البديلة واجريت نفس الخطوات في تكملة تحضيرالمستضد بكلا الصبغتين وبالتالي تم تعديل درجة الحموضة لهما الى مقدار 3,65 + 0,05 وقياس حجم الخلايا المتراصة (P.C.V) والتي يجب ان تكون 8% وبالتالي اجراء اختبار الروزبنكال (3، 4 ،11 ، 12) باستخدام المستضد في فحص نماذج المصول المختلفة للانسان والحيوانات اذ تم فحص 2394 نموذج مقارنة مع المستحضر المحضر بالصبغة القياسية وملاحظة النتائج وكذلك متابعة الفحوصات القياسية للمستضد لحين انتهاء مدة صلاحيته وهي لمدة سنة واكثر .

النتائج

بينت نتائج فحص الروزبنكال بكلا المستضدين المحضرين بالصبغة القياسية والصبغة البديلة لعينات مصول دم الانسان والحيوانات المختلفة كما مبين في الجدول 2 الذي يوضح انواع نماذج مصل الدم المفحوصة وقد قسمت الحالات الموجبة تبعا لنتائج فحص الروزبنكال الى سالبة واخرى موجبة لكل نوع من انواع المصل ويوضح الجدول ايضا عدد الحالات المتطابقة في النتائج والحالات غيرالمتطابقة والنسبة المئوية للتطابق وكان من مجموع 2394 حالة هناك 2367 حالة متطابقة في النتائج وبذلك تكون نسبة التطابق تشكل 98,87%.

مما سبق فقد بينت النتائج بأنه لم يكن الفرق معنوي احصائيا وذلك باجراء اختبار مربع كاي للمقارنة(14)

جدول1 يمثل مقارنة لصفات الصبغة البديلة عن الصبغة القياسية

الصفات	الصبغة القياسية	الصبغة البديلة
اسم الصبغة	صبغة الروزبنكال	صبغة الامارانث
تركيبها الكيمياوي	C20H2CI4I4N	C20H11N2Na3O10S3
اللون	وردي	وردي
التركيز	3.7 غم/ 386 مل	11.1غم / 386 مل
درجة الحموضةpH	3.65 + 0.5	3.65 + 0.5
درجة الثبوتية stability	مطابق لفترة الصلاحية المثبتة للصبغة القياسية المنتجة والبالغة سنة واكثر	ثابتة لمدة سنة و اكثر
قياس خلايا الدم المتراصة PCV	% 8	% 8
الكلفة	150 $ / 25 غم **	1000 دينار عراقي / 100غم * أي 9 سنت / 25 غم
توفرها في الاسواق المحلية	غير متوفرة في الاسواق المحلية لمحدودية استخدامها	متوفرة لاستخدامها في العديد من الصناعات الغذائية

* كلفةالصبغة البديلة تم الحصول عليها من الاسواق المحلية

** كلفة الصبغة القياسية حسب المصدر المأخوذ من موقع الانترنيت(http://www.vgdusa.com/Harleco_stains.htm

جدول 2 يمثل نتائج فحص الروزبنكال بالصبغة البديلة مقارنة نتائج الصبغة القياسية ويوضح مدى التطابق بينهما .

نوع مصل الدم	نتائج فحص** الروزبنكال	عدد الحالات المفحوصة	عدد الحالات المتطابقة	عدد الحالات غير المتطابقة	نسبة التطابق %
الانسان	– +	44 33	44 34	– 1	100 96.9
الاغنام	– +	158 1328	158 1312	– 16	100 98.9
الماعز	– +	100 93	100 90	– 3	100 96.7
الابقار	– +	160 151	160 146	- 5	100 96.6
الجاموس	– +	84 79	84 79	– +	100 100
الخيول	– +	100 38	100 36	– 2	100 100
الابل	– +	24 2	24 2	– –	100 100

*الفرق لم يكن معنويا احصائيا باجراء اختبار مربع كاي.

** (+) موجبة = أي درجة من درجات التلازن واضحة للعين المجردة تظهر خلال اربعة دقائق تعتبر نتيجة .

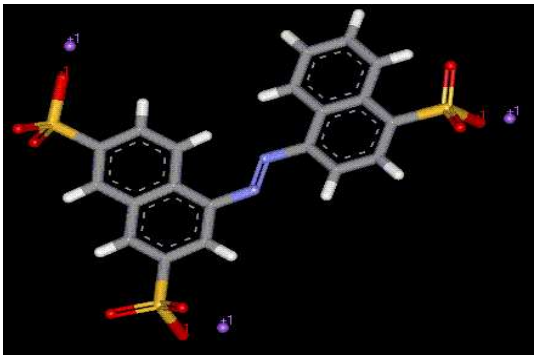
المناقشة

هناك بحوث عديدة استخدمت في تحضير مستضد الروزبنكال اصباغ اخرى بدلا من صبغة الروزبنكال مثل صبغة Brilliant green الخضراء اللون أو صبغة Crystal violet التي تعطي اللون البنفسجي ولكن يبقى اللون الوردي هو المفضل والسائد في تحضير مستضد الروزبنكال عند معظم الشركات العالمية المختصة في تحضير المستضدات ،اذ أن هناك سلبيات عديدة للصبغات الاخرى مثل اختلال درجة الحموضة حيث أن درجة الحموضةعامل حاسم في تقليل حدوث التفاعل المتسبب عن الاجسام المتلازنة غير الخاصة (Non_specific agglutination) التي توجد احيانافي مصول

الحيوانات (8) بينما من ايجابيات صبغة الروزبنكال القياسية والصبغة البديلة لها المستخدمة بالبحث هو ثبات درجة الحموضة طول فترة صلاحية المستضد بالاضافة الى ثبات اللون أي أكثر استقرارا من الصبغات الاخرى وكذلك لوحظ سرعة ذوبانها بالكامل بالماء المقطر أثناء التحضير .

تتكون صبغة الروزبنكال من التركيب الكيمياوي Tetrachlorotetraiodoflourescien sodium salt C20H2CLI4N والتي تسمى ايضا Acid red 94. وهي صبغة ثابتة في الدرجة الحرارية الطبيعية والضغط ويفضل تجنب تعرضها للضوء وهي مادة قوية الاكسدة والاختزال

تتكون صبغةالامارانث من التركيب الكيمياوي ثلاثي الصوديوم 2- هيدروكسي – 1 – (4 – سلفونات , – 1 – أفنيل ازو) نفثالين – 3 ، 6 – ثنائي السلمونيت ، وهي مادة صبغية مصنعة من القطران ذات لون احمر ارجواني بالاضافة الى كونها ملونات غذائية تستعمل كأصباغ وملونات في التصوير وكذلك في انتاج الصابون (13) . والصورة التالية تمثل التركيب البنائي لصبغة الامارانث.



عموما نتائج الفحوصات السيرولوجية حاليا تبين اختلافات فيما بينها وهذا يعود الى اختلاف الحساسية للاختبارات بالاضافة الى ميكانيكية انتاج الكلوبيولينات المناعية (Immunoglobulin) وبقاء ها (persistence) (10) ومعظم البحوث في مجال انتاج المستضدات تبحث عن تغييرات برامج الاختبارات (Testing protocols) التي قد ينتج عنها تغيير في حساسية وخصوصية الاختبار منها تغيير النسبة المئوية للمحاليل المستخدمة الى المصل ، فترة حضانة الاختبار، مقارنته مع الاختبارات الاخرى بالاضافة الى دراسة تركيز الخلايا (8%) للتشخيص في الماعز والاغنام وامكانية تغييرهذه النسبة الى أكثر أو أقل أو فيما يتعلق بدرجة حموضة المستضد (7، 9) .

يكشف اختبار الروزبنكال في مصول الحيوانات المصابة عن ثلاث انواع من الكلوبيولينات المناعية المضادة لجرثومة البروسيلا وهي IgM,IgG1,IgG2 (2) ففي الابقار يعتبر وجود IgM و IgG1 مؤشر واضح للاصابة أكثر من الانواع الاخرى ، بينما وجود IgM و IgG2 يكون مترابطا مع ارتفاع معيار الاجسام المضادة في الابقار الملقحة (9) .

اختبار الروزبنكال ذو حساسية عالية مع هذا كما في بقية الاختبارات المصلية في بعض الاوقات يعطي نتائج موجبة مع نماذج الحيوانات الملقحة بلقاح مرض البروسيلات عترة S19 واحيانا يعطي نتيجة سالبة كاذبة ولكن نادرالحدوث وهذا يرجع معظمه لوجود ظاهرة البروزون (Prozon) ويمكن الكشف عنها باستعمال الامصال المخففة ويمكن فحصها بعد فترة أخرى مع هذا يعتبر اختبار الروزبنكال الانسب في المسوحات للتحري عن القطعان المصابة أو تأكيد خلو القطعان من المرض Brucellosis _free(herds)12.

المصادر

1- المواصفة القياسية رقم (1531) ، ملونات الاغذ ية (امارنث) للجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية0

2 -Allan,G.S.;Chappel , R .J., William; P.&Mc Naught ,D.J.(1976) :A quantitative Comparison of The Sensitivity Of Serological Tests For Brucellosis To Different Antibody Classes , J. Hyg . (camb), 76:287-298.

3 – Alton ,G.G; Jones, L.M.; Angus,R .D.;Verger ,J.M.(1988):Techniques For The Brucellocellosis Laboratory . Institute National De La Recherche Agronomique ,Paris ,France .

4 – Alton , G.G.; Carter .G.R.; Kibor .A. C. and Pesti . L . (1990) : Veterinary Diagnostic Bacteriology chapter :1 . F .A.O. Rome .

5- Angus, R .D. &Barton C.E. (19984) : The Production Of Abuffered Plate Antigen For Use In A presumptive Test For Brucellosis . Dev. Biol. Stand , 56:349-356.

6- Bentkey ,K.W, (1960): The Natural Pigments Volume IV .Inter science Puplishers I N C .,New York .208-211 . .

7-Blasco, J.M.; B. Garin- Bastuji ;C.M. Marine; G. Gerbier ; J.Fanlo ; M.P. Jimenez de Bagyes,and C.Cau. (1994) :Efficacy Of Different Rosebengal and Complement Fixation Antigen For The Diagnosis Of Brucella melitesis Infection In Sheep And Goats .Vet. Rec. 134:415-420.

8- Corbel ,M . J . (1972) : Identification of the Immunoglobulin class active in the Rosebengal Plate Test For Bovine Brucellosis .J . Hyg . Com. 70 : 779 - 795 .

9- Mikolon, A .B; Gardner,I. A.; Hietala, S.K.; Anda, J.H.; Pestana ,E.C. ; Hennager. S.G. and Edomondson A.J. (1998) : Evalution Of North American Antibody Detection Test For Diagnosis Of Brucellosis In Gosts . J. Clin . Microb. June .1716-1722 .

10-Molnar.E.; Molnar.L; Vale , W.G. (1998) : Value Of Different Serological Tests In The Bovine Brucellosis In The Amazonian Region .Act. Vet .Hungarica. 46(2) , 199- 210.

11- O. I. E .Manual . (1992) :Bovine Brucellosis (B12) .262-276.

12- O. I. E . Manual.(1996). :Bovine Brucellosis .chapter 3.2.1. 292-254.

13-Scoles,G.T.; Pattacini, S.H. ; Coves , G.F.(2000) : Speration of the pigment of an amaranth . Molecules . 5 (3) :566- 567 Mar.

14-Snedecor , G.W. ; Cochran ,W. G. (1973) :Statistical Methods (6^{th} Eition .:The Lowa State Univesity Press , Ames.