Mesop. J. Mar. Sci., 2009, 24(2): 148- 159

استخدام تقنية الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA في التحري وتشخيص المصابين وغير المصابين بالأنواع المصلية لضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية Ogawa, Inaba, NAGs

عبد الإله عبد الحسين المياح

فرع الأدوية، كلية الصيدلة، جامعة البصرة، العراق

المستخلص استخدمت مصول لأشخاص مصابين بالأنواع المصلية لضمات الهيضة الوبائية Ogawa, Inaba و NAGs وأخرى لأشخاص أصحاء لغرض تحديد التراكيز المثلى من المستضد والتخافيف الملائمة من المقترن والمصل قيد الاختبار وبيان مستوى الأضداد المتواجدة في المصول بواسطة اختبار ELISA حيث وجد في ضمات الهيضة الوبائية للنوع المصلي Ogawa أن التركيز الأمثل للمستضد هو5 مايكروغرام/مل وعند تخفيف للمصل والمقترن 1:50 و 1:100 على التوالي. أما التركيز الأمثل لمستضد ضمات الهيضة الوبائية للنوع المصلي Inaba هي 10 مايكروغرام/مل وللمصل والمقترن 1:50 و 1:100 على التوالي. أما التركيز الأمثل لمستضد ضمات الهيضة غير المتلازنة NAGs هو 10 مايكروغرام/مل وتخفيف للمصل والمقترن 1:50 و 1:100 على التوالي. كما وجد أن أعلى مستوى للأضداد عند الأشخاص المصابين بضمات الهيضة الوبائية للنوع المصلي Ogawa ثم المصابين بالنوع المصلي Inaba وتلاه المصابين بالأنواع المصلية المختلفة الأخرى NAGs وهي على التوالي 1.97 ، 1.72 و 1.55 القيم مقدرة بالكثافة الضوئية عند الطول الموجي 492 نانومتر بينما أعطت نتائج غير المصابين بضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية Inaba, Ogawa و NAGs تراكيز أضداد لنفس الطول الموجي وهي 0.4، 0.39 و 0.36 للأنواع المصلية على التوالي. اظهر الاختبار معدل حساسية 95 % ومعدل خصوصية 90 % وعليه يمكن اعتماد تقنية ELISA في التشخيص وتحري المصابين والأصحاء بالأنواع المصلية لضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية Ogawa, Inaba وNAGs.

المقدمة

أخذت الاسهالات الجرثومية حيزاً مهماً في تفكير الإنسان على مر العصور وأحدها هو الإسهال المسبب من قبل زمرة ضمات الهيضة والذي قد يظهر على شكل أعراض حادة من إسهال مائي قاس، قيء وجفاف قد تؤدي إلى الوفاة أو بشكل أعراض أقل حدة (منظمة الصحة العالمية، 1997).

تتضمن زمرة ضمات الهيضة Cholera Group of Vibrios ضمات الهيضة النمط الأول01 المسببة لمرض الهيضة في الإنسان والذي يشمل بدوره الأنواع المصلية Hikojem، Ogawa وInaba (Shimada and Arakawa, 1993) وتبعهُ في عام 1992 النوع المصلي

الوبائي 0139 Bengal (Ramamurthy *et al*., 1993).

أما المجموعة الأخرى غير الوبائية فهي ضمات الهيضة غير المتلازنة NAGs; Non-Agglutinable Vibrios (Shimada and Arakawa, 1993).

أخذ تشخيص ضمات الهيضة الوبائية حيزاً كبيراً في مجال البحث والتطبيق العملي ابتداءاً من الفحص الجرثومي التقليدي مضافاً له الاختبارات السيرولوجبة المختلفة وبلغ تشخيص هذه الضمات ذروته عندما أدخلت تقنية تفاعل سلسة إنزيم البلمرة PCR (Katsuaki *et al*., 1998). كما تُعد طريقة ELISA من الفحوصات المتقدمة والأكثر دقة في التشخيص (WHO, 1976) وهو اختبار حساس لقياس معقدات الضد Ab والمستضد Ag بدرجة كبيرة جداً مقارنة مع فحوصات التلازن والترسيب.

أستندت الدراسة الحالية إلى إمكانية اعتماد اختبار المعايرة الامتصاصية المناعية المرتبطة بالإنزيم في التحري وتشخيص المصابين بضمات الهيضة الوبائية وللأنواع المصلية Ogawa ، Inaba وNAGs.

ولأهمية اختبار ELISA لما له من حساسية وخصوصية عاليتين وسرعة في تشخيص المصابين يستغرق التشخيص ساعتين بدل الفحص التقليدي والذي يعتمد على الفحص البكتريولوجي والاختبارات الكيميوحيوية ومن ثم الفحص السيرولوجي والذي قد يستغرق ذلك خمسة أيام مقابل الكلفة المـادية الكبيرة، لذا ارتأت الدراسة الحالية استخدام تقنية ELISA في التحري وتشخيص المصابين وغير المصابين بالأنواع المصلية لضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية Ogawa, Inaba و NAGs والذي يعتبر أول استخدام له في العراق.

المواد وطرق العمل

المبدأ العام لتقنية ELISA هو استعمال مقترن جسم مضاد مثل IgG معلم بإنزيم مع الأجسام المضادة قيد الاختبار (مصل الإنسان).

(1) ضمات الهيضة المستعملة في هذه الدراسة:

Vibrio cholerae Ogawa Biotype Eltor
V. cholerae Inaba Biotype Eltor
V. cholerae O139 Bengal Biotype Eltor (Almayah *et al*., 2001)
V. cholerae Non Agglutinable Vibrios Biotypes Eltor

(2) اخضعت العزلات السريرية اعلاه وبالتعاون مع المختبر المركزي للوقاية الصحية عام 2003 للفحوصات التشخيصية الكيميوحيوية والاختبارات السيرولوجية واستخدمت ضمات الاوكاوا والانابا كقرائن ضبط والمرسلة مسبقاً الى مختبر الصحة العامة / بغداد.

ضمات الهيضة غير المتلازنة *V. cholerae* : تم استخدام الأنواع المصلية لضمات الهيضة غير المتلازنة NAGs المستخدمة في بحث سابق (المياح واخرون، 2002) والتي تؤلف بمجموعها مجموعة مستضدية شاملة لأغلب مستضدات الأنواع المصلية لضمات الهيضة غير المتلازنة NAGs.

(3) المصول المستخدمة:
استخدمت مصول لأشخاص مصابين وغير مصابين بضمات الهيضة أصحاء أو مصابين بأمراض أخرى بعد التأكد منهم بالطريقة التقليدية وهي نقل المفرغات المعوية على وسط ناقل(Sea salt water) ثم يتبعه استنبات على وسط انتقائي هو Alkaline peptone water (APW)، ثم على وسط تشخيصي وانتقائي هو Thiosulfate Citrate Salt Sucrose Agar Bile (TCBS) ، ثم على وسط مغذي بعدها خضعت المستعمرات النامية إلى عدة اختبارات كيميوحيوية وباستخدام مصول متعددة التكافؤ وأحادية التكافؤ ضد أوكاوا (Monovalent anti Ogawa) وأحادية التكافؤ ضد أنابا (Monovalent anti Inaba) محضرة في المختبر (المياح واخرون، 2002) وأحادية التكافؤ ضدO139 Bengal (Biomurex, France) والتي بواسطتها يمكن تحديد النوع المصلي المسبب للهيضة. تم اعتبار الطريقة أعلاه كاختبار ضابط لمقارنة حساسية اختبار الـ ELISA. جُمعت كل عشرة عينات من الأمصال في عينة واحدة (Issa, 1997).

اختبار الـ ELISA
1. تحضير المستضد الجسمي Somatic Antigen Preparation
نُميت العزلات المصلية الوبائية Ogawa، Inaba، Bengal 0139 و NAGs على أطباق وسط Brain - Heart Infusion Agar BHIA لمدة 18 ساعة في درجة حرارة 37 درجة مئوية. وبعدها غُسلت المستعمرات النامية بماء الملح الفيزيولوجي 0.85 %. جمعت المستعمرات في قناني بلاستيكية حجم 25 مل وغُسلت ثلاث مرات بماء الملح الفيزيولوجي وُضبطت الرسابة الجرثومية لكل نوع مصلي إلى تركيز 6.4 × 10^9 خلية/مل ماء مقطر (Shimada and Arakawa, 1993). وضعت القناني في حمام مائي بدرجة حرارة 100 درجة مئوية لمدة ساعتين يتبعها تجميد العينات ومن ثم توضع القناني تحت جهاز التردد الصوتي الفائق Ultrasonic, 465 لمدة خمس دقائق وتُعاد العملية ثلاث مرات بعد كل تجميد. رسبت الخلايا المجزأة بواسطة جهاز الطرد المركزي 3500 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة حيث اعتبر الراشح هو المستخلص المستضدي لذلك النوع المصلي (Almayah, 1996). رُسب الراشح بإضافة 2.67 مولاري من كبريتات الامونيوم تدريجياً مع التحريك بعدها تركت ليلة كاملة (15ساعة) بدرجة حرارة 4 درجة مئوية. بعد ذلك طرد الراشح مركزيا بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، عُلق الراسب في 5 مل من الماء المقطر ووضع في أكياس ديلزة خاصة مع ماء جاري لمدة ساعتين ثم 18 ساعة في ماء مقطر يحتوي على 20 غم من الفحم الفعال Fluka (Shimada and Arakawa, 1993)، بعدها جفدت العينات بواسطة جهاز التجفيد Lyophilization Pirani 0.1 ثم حُفظت المتستضدات في مكان جاف وبوجود هلام السيلكا. أما مستضدات الأنواع المصلية لضمات الهيضة غير المتلازنة NAGs فقد تم جمع أوزان متساوية منها وبشكل مفرد aliquots (التميمي، 2001).
2. صفيحة بلاستيكية تحوي حفر 8 × 12 (polystyrene microtiterplate).
3. محلول دارئ الفوسفات Phosphate Buffer Saline (PBS): أذيب 21.3 غم من Na_2HPO_4 في لتر من الماء المقطر و 20.4 غم من KH_2PO_4 في لتر من الماء المقطر و8.8 غم من NaCl وأذابتها في لتر من الماء المقطر. تخلط الحجوم الآتية 76 مل، 24 مل و 100 مل على التوالي. الأس الهيدروجيني 7.2 (Appassakij *et al.*, 1987).

4. المقترن وهو الضد IgG البشر محضر من مصل الأرنب مقترن بإنزيم البيروكسيد يحوي صبغة حمراء ومواد حافظة ومثبتات البروتين (Bioelisa).
5. مخفف العينات وهو محلول منظم مع مثبت البروتين مع صوديوم ازايد كمادة حافظة (Bioelisa).
6. محلول الغسل (Bioelisa) وهو منظم فوسفاتي يحوي 1 % توين 20 و 0.01 % ثايميروسال.
7. محلول المادة الأساس (Bioelisa) وهو محلول منظم لسترات-اسيتات يحوي بيروكسيد الهيدروجين.
8. الكروموجين (Bioelisa) وهوTMB 3,3,5,5,' Tetramethylbenzidin مذاب في dimethyl sulphooxide.
9. السيطرة الموجبة وهو مصل لأشخاص مصابين بضمات الهيضة ويحوي أضداد مضادة لتلك الضمات كلٍ على حدة.
10. السيطرة السالبة وهو مصل لأشخاص ٍغير مصابين بضمات الهيضة.
11. محلول الإيقاف وهو عبارة عن حامض الكبريتيك 1N.

إجراء الاختبار

قبل إجراء الاختبار وضعت جميع الكواشف في درجة حرارة الغرفة. وباستخدام الصفيحة البلاستيكية polystyrene microtiter plate والتي تحوي على 8 × 12 حفرة.ُترك منها ستة حفر استخدمت لثابت معايرة جهازالمطياف والسيطرة. ولغرض اجراء المعايرة Checker board) titration) استخدمت مستضدات ضمات الهيضة المشار لها سابقاً وبتراكيز مختلفة هي 5 مايكروغرام/مل، 10 مايكروغرام/مل، 20 مايكروغرام/مل، في 200 مايكرولتر من محلول التخفيف ثم حُفظت في مكان رطب ودرجة حرارة 4 درجة مئوية ولمدة ليلة كاملة. أُزيلت محتويات الحفر وملئت بالكامل بمحلول الغسل تقريباً 300 مايكرولتر وكُررت عملية السحب والغسل اكثر من خمس مرات بعدها جففت الصفيحة بواسطة ورقة ترشيح لإزالة السائل الملتصق. استخدمت تخافيف مضاعفة هي 1:50، 1:100، 1:200، 1:400 و 1:800 من المصول قيد الاختبار المصابين وغير المصابين بضمات الهيضة كما استخدمت مصول لأشخاص غير مصابين بالهيضة لكنهم مصابين بأمراض أخرى مثل Toxoplasmosis و Brucellosis أو Viral hepatitis (الوافدين إلى الرعاية الصحية) وبواقع 100 مايكرو مل لكل حفرة. غُطيت الأطباق وحُضنت بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة ساعة واحدة. سُحبت محتويات الحفر ومُلئت بالكامل بمحلول الغسل 300 مايكرولتر. كررت عملية السحب والغسل أكثر من خمسة مرات بعدها جُففت الصفيحة بواسطة ورقة ترشيح لإزالة السائل الملتصق.

استخدمت تخافيف مختلفة من المقترن والذي هو الضد IgG البشر المحضر من مصل الأرنب والمقترن بأنزيم البيروكسيديز. والتخافيف هي 1:100, 1:200, 1:400 و 1:800.ُنقل 100 مايكرولتر إلى كل حفرة ماعدا الحفر الضابطة. غُطيت الصفيحة بالغطاء المخصص لها بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة نصف ساعة، وخلال 5 – 10 دقيقة الأخيرة من الحضن ُحضر محلول كروموجين-المادة الأساس حيث أضيف 280 مايكرولتر من الكروموجين TMB إلى14 مل من محلول منظم المادة الأساس وهي كمية تكفي إلى صفيحة كاملة.

أزيل غطاء الصفيحة وسُحب المحلول وبعدها غُسلت بمحلول الغسل أكثر من أربعة مرات

وبعدها أُضيف 100 مايكرولتر من محلول المادة الأساس-TMB. ضُبط المطياف عند الطول الموجي 492 نانومتر مع الحفر الضابطة وقُرئت الامتصاصية بواسطة جهاز-Organon Micro ELISA reader لكل حفرة خلال 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.بعدها أُضيف 100 مايكرو مل من محلول الإيقاف (حامض الكبريتيك 1N) وبنفس التوزيع أضيف محلول المادة الأساس-TMB(Issa, 1997).

تحديد نقطة القطع Cut-off point determination

حددت نقطة القطع بواسطة المعادلة الآتية:-

Cut-off point= X+ (2 *SD)

حيث أن:

X = معدل قراءات الامتصاصية للأشخاص غير المصابين.

SD= الانحراف المعياري للقراءات السالبة.

وبذلك فان قراءة الكثافة الضوئية OD التي تساوي أو اقل من نقطة القطع تعتبر سالبة أما القراءة الأكبر من هذه القيمة تعتبر قراءة موجبة.

التحليل الإحصائي

كررت الاختبارات 3-5 مرات وتم استخدام معدلها SE=0.02. معدل الحساسية، الخصوصية والدقة لاختبار ELISA كالآتي:

Sensitivity = { a/a + c × 100};
specificity = { d/b + c ×100}
and accuracy = { a + d / a + b + c + d } × 100

حيث أن:

a : عدد العينات الموجبة الصادقة.

b : عدد العينات الموجبة الخاطئة

c : عدد العينات السالبة الخاطئة

d : عدد العينات السالبة الصادقة

العينات الموجبة في اختبار ELISA والسالبة في اختبار الطريقة التقليدية اعتبرت عينات موجبة خاطئة. أما العينات السالبة في اختبار ELISA والموجبة في اختبار الطريقة التقليدية اعتبرت عينات سالبة خاطئة (Appassakij *et al.*, 1987).

النتائج والمناقشة

نتائج اختبار المعايرة

المستضدات المستخدمة من ضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية:

Vibrio cholerae Ogawa Biotype Eltor
V. cholerae Inaba Biotype Eltor
V. cholerae O139 Bengal Biotype Eltor
V. cholerae Non Agglutinable Vibrios Biotypes Eltor

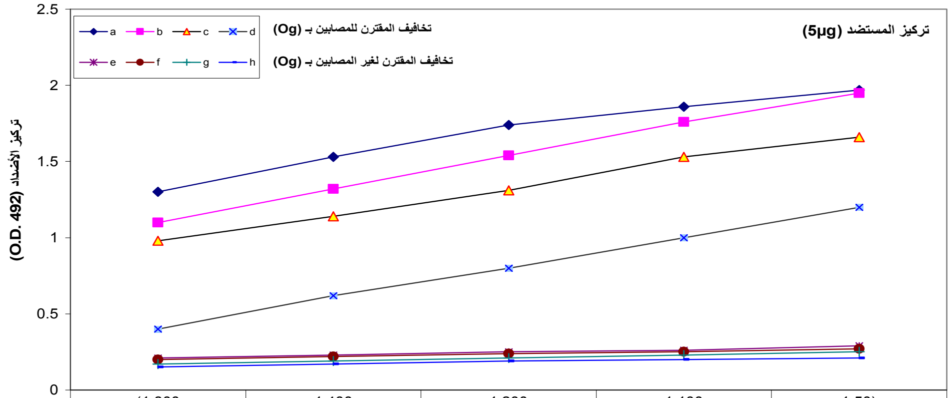
المصول الموجبة والسالبة والمقترن تم استخدامها بتراكيز مختلفة لغرض بيان التراكيز المثلى التي يمكن اعتمادها في اختبار ELISA وكما مبين في الأشكال (1- 9) حيث لوحظ في ضمات الهيضة الوبائية للنوع المصلي Ogawa (الأشكال 1-3) أن التركيز الأمثل للمستضد هو 5 مايكروغرام/مل وعند تخفيف للمصل والمقترن 1:50 و 1:100 على التوالي وعليه يمكن الاعتماد على تلك التراكيز في اختبار ELISA للتحري وتشخيص المصابين وغير المصابين بالنوع المصلي Ogawa. أما التركيز الأمثل لمستضد ضمات الهيضة الوبائية للنوع المصلي Inaba وكما موضح في الأشكال 4-6 هي 10 مايكروغرام/مل، وعند تخفيف للمصل والمقترن 1:50 و 1:100 على التوالي. أما في الأشكال (7 - 9) لوحظ أن التركيز الأمثل لمستضد ضمات الهيضة غير المتلازنة NAGs هو 10 مايكروغرام/مل وعند تخفيف للمصل والمقترن 1:50 و 1:100 على التوالي. كما لوحظ عند التراكيز المثلى أن أعلى مستوى للأضداد عند الأشخاص المصابين بضمات الهيضة الوبائية للنوع المصلي Ogawa ثم المصابين بالنوع المصلي Inaba وتلاه المصابين بالأنواع المصلية المختلفة الأخرى NAGs وهي كانت على التوالي 1.97، 1.72 و 1.55 (القيم مقدرة بالكثافة الضوئية عند الطول الموجي492 نانومتر) (التميمي، 2001). بينما أعطت نتائج غير المصابين بضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية Inaba, Ogawa و NAGs تراكيز أضداد لنفس الطول الموجي وهي 0.4 ، 0.39 و 0.36 للأنواع المصلية على التوالي.

أما بالنسبة لضمات الهيضة الوبائية للنوع المصلي O139 Bengal فإنها ممثلة بعينة واحدة وبذلك لا يمكن الاعتماد عليها إحصائيا (Steel, 1960).

العينات السالبة غير المصابين وجد أن أعلى امتصاصية لهم 0.4 التي تعتبر الحد الأدنى للتمييز بين العينات الموجبة والسالبة.

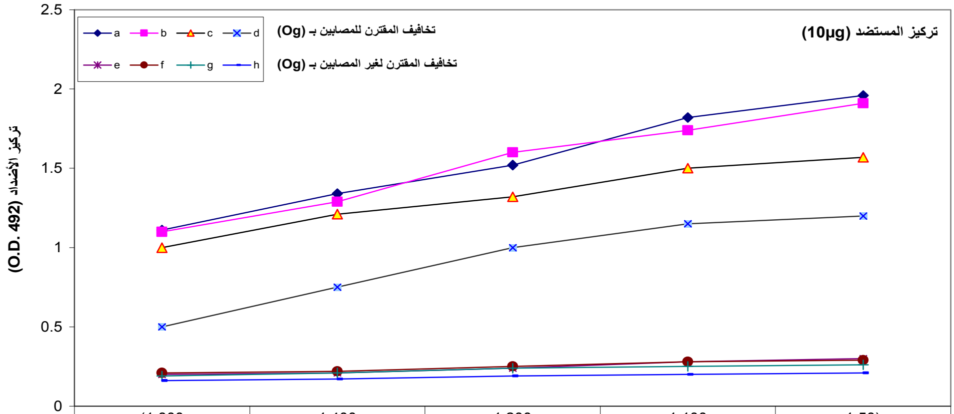
الدراسة الحالية حددت التراكيز المثلى من المستضد والمقترن والمصل قيد الاختبار والتي يمكن الاعتماد عليها في التحري وتشخيص المصابين والأصحاء بضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية Inaba, Ogawa و NAGs. أعطى الاختبار حساسية وخصوصية عاليتين مقارنتاً بالاختبار التقليدي والذي يعتمد على التلازن البسيط على الشريحة الزجاجية حيث انه في أحيان كثيرة لا يمكن الجزم بنتيجة التلازن إيجاباً أم سلباً حيث يعتمد فيه على العين المجردة بينما في اختبار ELISA تقرئ النتائج بواسطة جهاز المطياف (WHO, 1976). كما أن الطريقة التقليدية في التحري عن المصابين بضمات الهيضة الوبائية تتطلب أوساط زراعية غالية الثمن مثل وسط ملح البحر وماء الببتون القاعدي وكذلك وسط kligler iron agar. بينما في اختبار ELISA يتطلب مواد يمكن تحضيرها في المختبر ويتطلب الاختبار منها فقط عدة مايكرو غرامات. كما أن أتباع الطريقة التقليدية والتي تعتمد على إكثار ضمات الهيضة بواسطة الأوساط الزرعية قد يكون ذلك مصدر للتلوث البيئي بتلك الضمات.

أن سرعة تشخيص المصابين (يستغرق التشخيص ساعتين ولعدة أشخاص في وقت واحد) يجعله أسهل استعمالا من الفحص التقليدي والذي يعتمد على الفحص البكتريولوجي والاختبارات الكيميوحيوية ومن ثم الفحص السيرولوجي والذي قد يستغرق ذلك خمسة أيام مقابل الكلفة المادية الكبيرة, وعليه ترى الدراسة الحالية انه من المناسب استخدام تقنية ELISA في التحري وتشخيص المصابين وغير المصابين بالأنواع المصلية لضمات الهيضة الوبائية وغير الوبائية Ogawa, Inaba و NAGs.



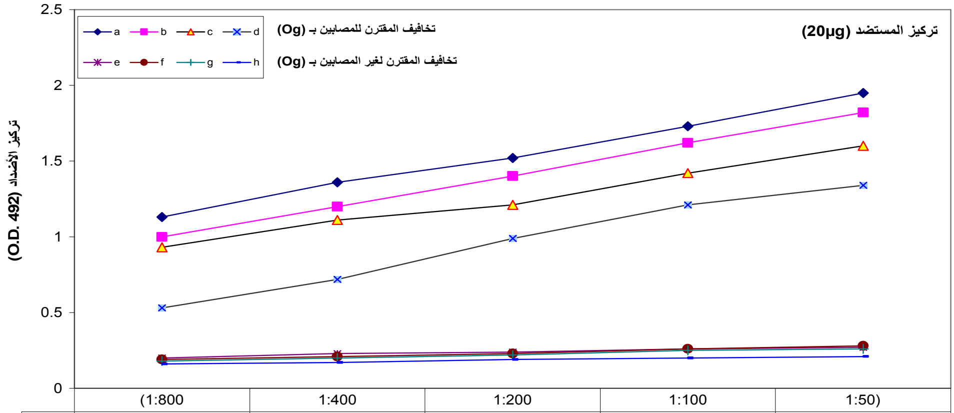
	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	1.3	1.53	1.74	1.86	1.97
b	1.1	1.32	1.54	1.76	1.95
c	0.98	1.14	1.31	1.53	1.66
d	0.4	0.62	0.8	1	1.2
e	0.21	0.23	0.25	0.26	0.29
f	0.2	0.22	0.24	0.25	0.27
g	0.17	0.19	0.21	0.23	0.25
h	0.15	0.17	0.19	0.2	0.21

شكل 1: تركيز المستضد (5 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة الوبائية Ogawa.



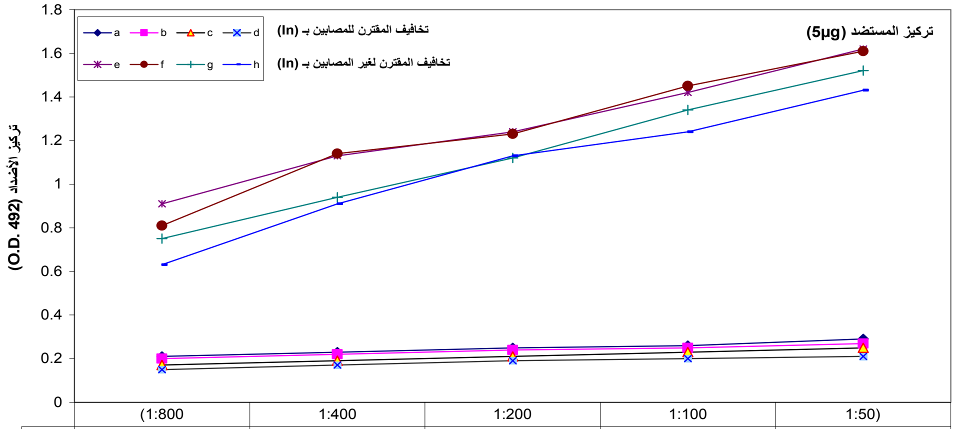
	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	1.11	1.34	1.52	1.82	1.96
b	1.1	1.29	1.6	1.74	1.91
c	1	1.21	1.32	1.5	1.57
d	0.5	0.75	1	1.15	1.2
e	0.2	0.21	0.24	0.28	0.3
f	0.21	0.22	0.25	0.28	0.29
g	0.19	0.21	0.24	0.25	0.26
h	0.16	0.17	0.19	0.2	0.21

شكل 2: تركيز المستضد (10 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة الوبائية Ogawa.



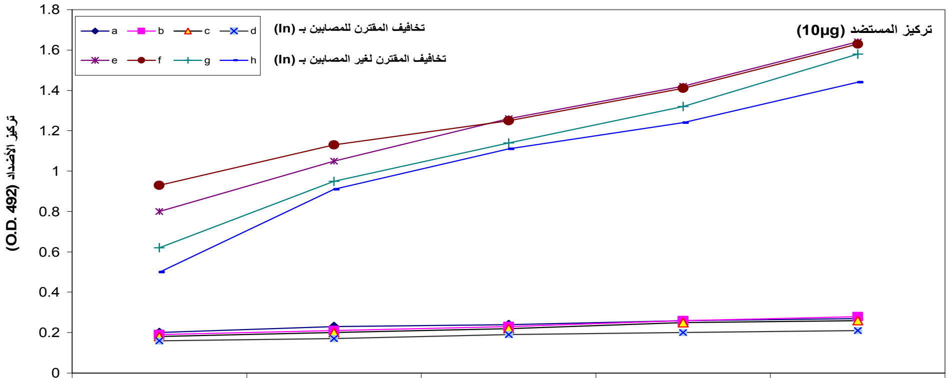
	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	1.13	1.36	1.52	1.73	1.95
b	1	1.2	1.4	1.62	1.82
c	0.93	1.11	1.21	1.42	1.6
d	0.53	0.72	0.99	1.21	1.34
e	0.2	0.23	0.24	0.26	0.27
f	0.19	0.21	0.23	0.26	0.28
g	0.18	0.2	0.22	0.25	0.26
h	0.16	0.17	0.19	0.2	0.21

شكل 3: تركيز المستضد (20 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة الوبائية Ogawa.



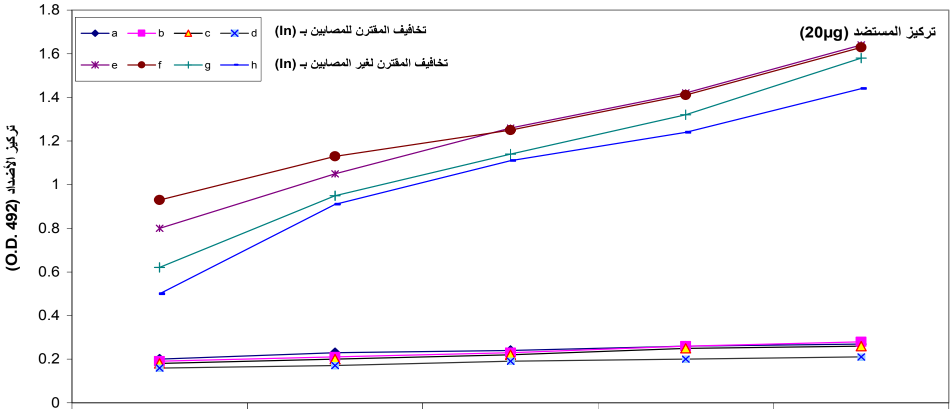
	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	0.21	0.23	0.25	0.26	0.29
b	0.2	0.22	0.24	0.25	0.27
c	0.17	0.19	0.21	0.23	0.25
d	0.15	0.17	0.19	0.2	0.21
e	0.91	1.13	1.24	1.42	1.62
f	0.81	1.14	1.23	1.45	1.61
g	0.75	0.94	1.12	1.34	1.52
h	0.63	0.91	1.13	1.24	1.43

شكل 4: تركيز المستضد (5 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة الوبائية Inaba.



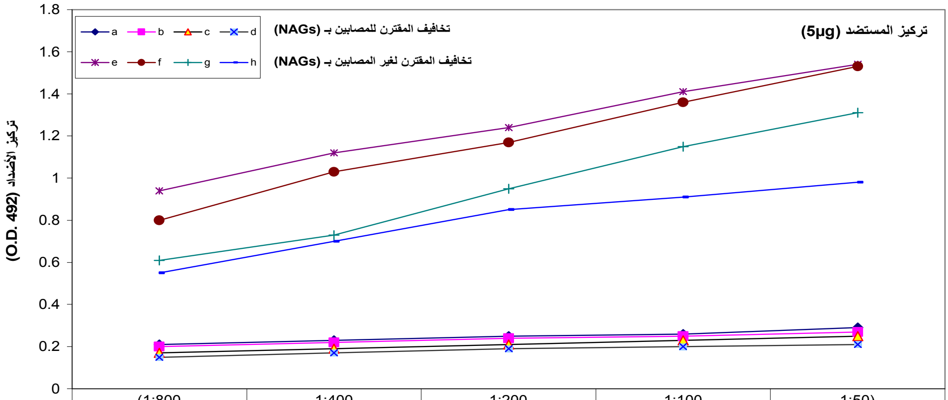
	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	0.2	0.23	0.24	0.26	0.27
b	0.19	0.21	0.23	0.26	0.28
c	0.18	0.2	0.22	0.25	0.26
d	0.16	0.17	0.19	0.2	0.21
e	0.8	1.05	1.26	1.42	1.64
f	0.93	1.13	1.25	1.41	1.63
g	0.62	0.95	1.14	1.32	1.58
h	0.5	0.91	1.11	1.24	1.44

شكل 5: تركيز المستضد (10 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة الوبائية Inaba.



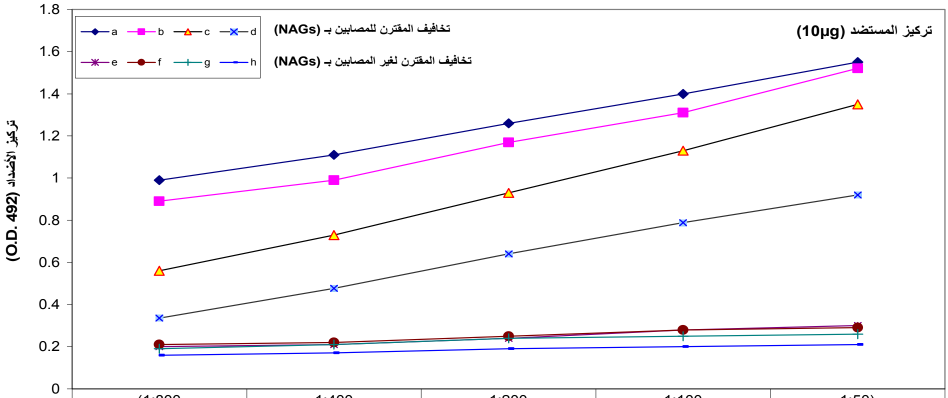
	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	0.2	0.23	0.24	0.26	0.27
b	0.19	0.21	0.23	0.26	0.28
c	0.18	0.2	0.22	0.25	0.26
d	0.16	0.17	0.19	0.2	0.21
e	0.8	1.05	1.26	1.42	1.64
f	0.93	1.13	1.25	1.41	1.63
g	0.62	0.95	1.14	1.32	1.58
h	0.5	0.91	1.11	1.24	1.44

شكل 6: تركيز المستضد (20 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة الوبائية Inaba.



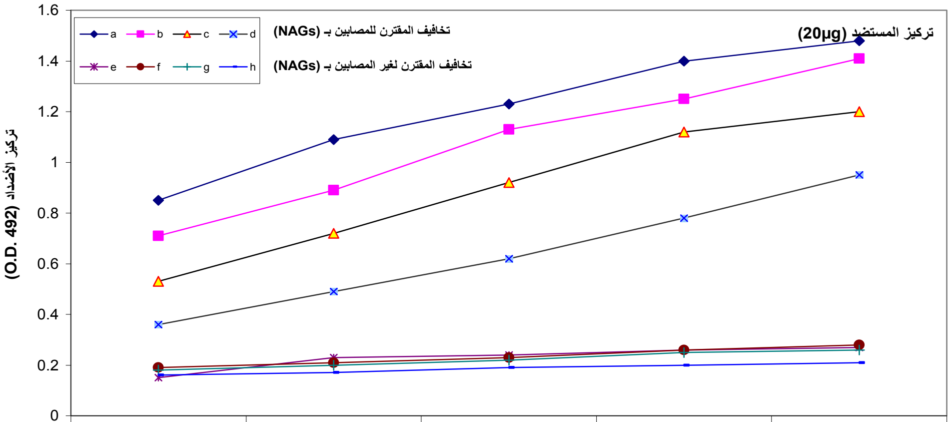
	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	0.21	0.23	0.25	0.26	0.29
b	0.2	0.22	0.24	0.25	0.27
c	0.17	0.19	0.21	0.23	0.25
d	0.15	0.17	0.19	0.2	0.21
e	0.94	1.12	1.24	1.41	1.54
f	0.8	1.03	1.17	1.36	1.53
g	0.61	0.73	0.95	1.15	1.31
h	0.55	0.7	0.85	0.91	0.98

شكل 7: تركيز المستضد (5 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة غير الوبائية NAGs.



	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	0.99	1.11	1.26	1.4	1.55
b	0.89	0.99	1.17	1.31	1.52
c	0.56	0.73	0.93	1.13	1.35
d	0.336	0.477	0.64	0.788	0.92
e	0.2	0.21	0.24	0.28	0.3
f	0.21	0.22	0.25	0.28	0.29
g	0.19	0.21	0.24	0.25	0.26
h	0.16	0.17	0.19	0.2	0.21

شكل 8: تركيز المستضد (10 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة غير الوبائية NAGs.



	(1:800	1:400	1:200	1:100	1:50)
a	0.85	1.09	1.23	1.4	1.48
b	0.71	0.89	1.13	1.25	1.41
c	0.53	0.72	0.92	1.12	1.2
d	0.36	0.49	0.62	0.78	0.95
e	0.15	0.23	0.24	0.26	0.27
f	0.19	0.21	0.23	0.26	0.28
g	0.18	0.2	0.22	0.25	0.26
h	0.16	0.17	0.19	0.2	0.21

شكل 9: تركيز المستضد (20 µg) وتخافيف مختلفة من المقترن مع تخافيف مختلفة لأمصال أشخاص مصابين وغير المصابين بضمات الهيضة غير الوبائية NAGs.

المصادر

التميمي، تماضر، 2001. عزل وتنقية مستضدين نوعيين من عزلة محلية لجرثومة *S. typhi* واستخدامهما في اختبار ELISA. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة البصرة.

المياح، عبد الإله عبد الحسين والحديثي، هديل توفيق وهاشم، علي رحيم، 2002. تحضير مصول تشخيصية متعددة التكافؤ للانواع ألمصلية الوبائية لجرثومة *Vibrio cholerae* ومصول احادية التكافؤ لتشخيص الأنواع المصلية لها. براءة اختراع. (2001/456).

منظمة الصحة العالمية، 1997. دلائل وإرشادات حول مكافحة الكوليرا.

Appassakij, H., N. Bunchuin, S. Sarasombath, B. Rangpitarangsi, S. Manatsath, P. Komolpit and T. Sukosol, 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Salmonella typhi protein antigen; J. Clin. Microbiol. 25 ,273–277.

Almayah, A., Alhadethy, H., Hashim, A., Majeda, A. and Karyma, J. 2001. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: the new serogroup causing cholera in Iraq.

Almayah, A. 1996. The effect of nutritional status on some Bactriological and immunological parameters in human and mice. M. Sc. Thesis. Basrah Univer. Science College.

Issa, A. 1997. Bactriological and immunological study on *E. coli* O157:H7 isolated from in patient children with diarrhoeal disease in Basrah city. Ph.D. thesis. Basrah University, Science College.

Katsuaki, H and T. Shimada, 1998. Development and evaluation of amultiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. Current microbiology, 20: 201-207.

Ramamurthy, T., R. Gargs, Sharma, 1993. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with endemic potential in India.

Shimada, T. and E. Arakawa, 1993. Extended serotyping scheme for *V. cholerae*. Current microbiology. 28:175-178.

Steel, R. 1960. Eds principles and procedures of statistics with special reference. McGraw-hill Book Company, Inc., New York. pp.161-213.

WHO, 1976. The enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. Bull. WHO, 24:129-139.

ELISA for screening and diagnosis of infected and non-infected people by epidemic and non-epidemic *V. cholerae*

A.A. Almayah

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Basrah University, Iraq

Abstract Infected patient's sera by epidemic and non-epidemic cholera Ogawa, Inaba, and NAGs and other from healthy persons were used to determine the optimum antigen concentrations and different dilutions of conjugate and serum under study. The optimum concentration of Ogawa antigen was 5 µg/ml with serum and conjugate dilution was 1:50 and 1:100 respectively, for Inaba antigen was 10 µg/ml with serum and conjugate dilution 1:50 and 1:100 respectively, while for NAGs, the optimum antigen concentration was 10 µg/ml with serum and conjugate dilution was 1:50 and 1:100 respectively. The highest antibodies concentration were recorded in person infected by Ogawa then Inaba and NAGs infection had less antibody concentration 1.97 , 1.72 and 1.55 respectively (value estimated by optical density 492 nm). The results of healthy person non infected by epidemic Ogawa, Inaba nor non-epidemic NAGs which reached about 0.4, 0.39 and 0.36 respectively. The present study show high sensitivity and specificity rate were 95 % and 90 % respectively. Hence the present study recommends depending ELISA test for diagnose and screening infected and non-infected population by epidemic Ogawa, Inaba or non-agglutinable (NAGs).