## الملخص

أجريت هذه الدراسة للتعرف على مدى الإصابة بمرض البروسيلا المالطية في الإنسان والحيوانات (المعز والأغنام) لمدينة الكوت للمدة مابين شهر أيلول لعام 2007 ولغاية شهر مايس لعام 2008. وكذلك تضمنت الدراسة استخلاص وتنقية عديد السكرايد الشحمي والذي يُعد المسؤول عن أمراضية هذه البكتريا فضلاً عن استعمال عديد السكرايد الشحمي المنقى جزئياً ومستضدات بكتريا البروسيلا المالطية الكاملة المقتولة حرارياً كمستضدين في فحص الاليزا للكشف عن حالات الإصابة بالمرض في الإنسان والحيوانات (المعز والأغنام).

ويمكن تلخيص أهم ما جرى في هذه الدراسة:-

- جمعت 300 عينة دم وكانت بواقع 100 عينة لكل من الإنسان والمعز والأغنام المشتبه بإصابتها بمرض البروسيلا (داء البروسيلات) و60 عينة دم بواقع 20 عينة لكل من الإنسان والمعز والأغنام جميعها كانت غير مصابة بمرض البروسيلوسز وليس لها تاريخ الإصابة بالمرض وحسب نتائج الفحوص المصلية المجراة (الروزبنكال و 2 – المركابتوايثانول). فقد بلغت حالات الإصابة بالنسبة للعينات المشتبه أصابتها بالمرض 205 حالة (67.33%) وكانت بواقع 58 و 83 و 64 حالة لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي.

- بينت الدراسة وباستعمال فحص 2 – المركابتوايثانول بان عدد العينات الموجبة للإصابة بالطور المزمن للمرض قد بلغت 19 عينة (9.27%) وكانت بواقع 12 و 5 و 2 عينة لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي مقابل 186 عينة للطور الحاد للمرض (90.73%) بواقع 46 و 78 و 62 عينة لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي.

- لغرض عزل البكتريا سحب مقدار 8 – 10 مليلتر عينة دم من الحالات المصابة استعملت بعدها طريقة العزل بوساطة كاستيندا ثنائي الطور، وجاءت النتائج بالحصول على 41 عزلة بواقع 8 و 22 و 11 عزلة لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي من مجموع 205 عينة بنسبة 20% وقد تميزت الطريقة بقصر المدة الزمنية للعزل.

- أجريت عدد من الفحوص الشكلية والكيميوحيوية لتشخيص العزلات الإحدى والأربعون. تضمنت الفحص المجهري المباشر، إذ ظهرت جميع العزلات بلون احمر وبشكل عصوي كروي عند صبغها بصبغة كرام وصبغة زيل نيلسن المحورة، كما وأعطت

جميع العزلات نتيجة موجبة لكل من فحص الكاتليز والاوكسيديز واليوريز ونتيجة سالبة لفحص IMVIC وعدم قدرتها على أنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين. في حين أظهرت جميع العزلات القدرة على اختزال النترات إلى نتريت بعد الزراعة في وسط اختزال النترات وكما أظهرت عزلتين من مجموع 41 عزلة (4.87%) نمواً قليلاً أو ضعيفاً على أكار الماكونكي في حين لم تنمو العزلات المتبقية على هذا الوسط.

- تمكنت جميع العزلات من النمو في الوسط الحاوي على الصبغات المثبطة للنمو البكتيري بوجود صبغة الفوكسين القاعدي وبتركيزيين هما 1:50000 و 1:100000. كما وأظهرت نتائج دراسة تحديد النمط الحيوي للعزلات بان 8 عزلات وبواقع 2 و 5 و 1 عزلة لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي من مجموع 41 عزلة بنسبة 19.51% قد تلازنت فقط مع المصل الأحادي الخاص لـ ((A Brucella abortus لذا كان نمطها الحيوي 2. بينما الـ 33 عزلة المتبقية بواقع 6 و 17 و 10 عزلات لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي بنسبة 80.49% قد تلازنت في آن واحد مع المصل الحادي الخاص بالـ Brucella abortus والمصل الأحادي الخاص بالـ (Brucella melitensis (M وكان نمطها الحيوي 3.

- تبين ان جميع العزلات المعزولة من الحالات المصابة كانت في الطور الأملس إذ اصطبغت المستعمرات باللون الأزرق المخضر عند فحصها بالضوء وبعد تلوينها بمحلول البلورات البنفسجية.

- أبدت جميع العزلات سالبيتها لاختبارات عوامل الضراوة متمثلة بإنزيمات (الهيمولايسين، الجيلاتيينيز، اللسثينيز، DNAase).

- استعملت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري على إنتاج البتالاكتميز وأظهرت جميع العزلات نتيجة سالبة لإنتاج الأنزيم.

- اجري فحص الحساسية لـ 22 مضاداً حيوياً بطريقة الأقراص وأظهرت جميع العزلات حساسيتها لكل من Streptomycin, Pipracillin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Rifampicin and Doxycyclin بنسبة 100%.

كانت نسبة كل من Chloramphenicol 92% و كل من Tetracycline و Gentamycin بنسبة 80% لكل منهما.

كانت مقاومة 100% لكل من Ampicillin, Augmentin, Ceftriaxone,

Amoxicillin, Nalidixic acid, Lincomycin, Penicillin G, Cloxacillin, Trimethoprin and وخليط lindamycin, Vancomycine .Sulfamethoxazole

- اختيرت العزلة المحلية (Brucella melitensis (biotype 3 المعزولة من احد الأشخاص المصابين بالمرض إذ مثلت أعلى رقم عزل وأظهرت مستعمراتها نموذجية لبكتريا البروسيلا فضلا عن سرعة نموها لغرض استخلاص عديد السكرايد الشحمي بطريقة الفينول المائي الساخن وبتركيز 90%، وقد وجد أن عديد السكرايد الشحمي قد تركز في الطور الفينولي المرسب بخطوة كاشف الميثانول، وتم تنقيته باستعمال هلام السيفاروز 4B إذ تم متابعة وجوده في الأجزاء المفصولة بوساطة قياس الكربوهيدرات في تلك الأجزاء عند طول موجي 490 نانوميتر، إذ لوحظ انفصال أربع قمم كاربوهيدراتية ثلاث منها رئيسية وقمة صغيرة ثانوية. كما تم متابعة البروتين في الأجزاء المفصولة نفسها عند طول موجي 280 نانوميتير ولوحظ انفصال 6 قمم بروتينية ترافقت ثلاث منها مع مجموعة الكربوهيدرات.

- أظهرت نتائج تقدير كمية الكربوهيدرات الموجودة في كل من عديد السكرايد الشحمي الخام والمنقى جزئياً قد بلغ 55 مايكروغرام / ملليتر و 78 مايكروغرام / ملليتر على التوالي. كما وبينت نتائج تقدير كمية البروتين الموجودة في كل من عديد السكرايد الشحمي الخام والمنقى جزئياً قد بلغ 46 مايكروغرام / ملليتر و 24 مايكروغرام / ملليتر على التوالي. فضلا عن تقدير كمية الدهون الموجودة في كل من عديد السكرايد الشحمي الخام والمنقى جزئياً قد بلغ 38 مايكروغرام / ملليتر و 63 مايكروغرام / ملليتر على التوالي.

- بينت نتائج أهمية استعمال فحص الاليزا في الكشف عن الإصابة بمرض البرسيلوسز باستعمال كل من عديد السكرايد الشحمي المنقى جزئياً من العزلة المحلية Brucella (melitensis (biotype 3 وبمقدار 10 و 5 و 10 مايكروغرام / حفرة لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي. ومستضدات بكتريا البروسيلا المالطية الكاملة والمقتولة حرارياً للعزلة نفسها بمقدار 40 و 20 و 20 مايكروغرام / حفرة لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي.

- أظهرت حساسية الفحص 100% لكل من الإنسان والمعز والأغنام باستخدام كل من متعدد السكرايد الشحمي المنقى جزئياً ومستضدات بكتريا البروسيلا المالطية المقتولة

حراريا. بينما أظهرت خصوصية الفحص باستخدام متعدد السكرايد الشحمي المنقى جزئياً 90% و 95% و 95% لكل من الإنسان والمعز والأغنام على التوالي. بينما باستخدام مستضدات بكتريا البروسيلا المالطية الكاملة المقتولة حرارياً كانت الخصوصية 100% لكل من الإنسان والمعز والأغنام.


## Abstract

This study was performed to identify the extent of the infection with Brucellosis (Brucella melitensis) in humans, goats and sheep in Kut city for the period from September 2007 till May 2008. It also included extraction and purification of the lipopolysaccharide which is responsible for the pathogenicity of this bacteria and using the partially purified lipopolysaccharide and Brucella melitensis heat killed antigens in the ELISA test to diagnose brucellosis in humans, goats and sheep.

Results obtained could be summarized as follows:-

- Three hundred blood samples were collected of which 100 blood samples were from humans, goats and sheep respectively and all were suspected in having brucellosis while Sixty blood sample were collected of which 20 blood samples were from humans, goats and sheep respectively and all were known in not being suspected in having brucellosis and has no history in having such disease according to the performed serological tests (Rose Bengal test and 2-Mercaptoethanol test). The recorded cases for the brucellosis suspected samples were 205 Cases (67.33 %) of which 58 , 83, 64 case were from humans, goats and sheep respectively.

- With the use of 2 – Mercaptoethanol test, the study showed that the chronic phase positive cases reached to 19 samples (9.27%) and were 12, 5 and 2 samples for humans, goats and sheep respectively, while the acute phase positive cases were 186 (90.73

%) samples of which 46, 78 and 62 were from humans, goats and sheep respectively.

- For the purpose of bacterial isolation, blood sample with amount of 8 – 10 milliliter has been withdrawn from the infected cases. Later by using Castaneda diphase medium isolation method the results showed that out of 205 a 41 (20%) isolates of which 8, 22 and 11 isolates from humans, goats and sheep respectively were positive for the test. This method has been characterized by its time shortness for isolation.

- A number of morphological and biochemical tests had been carried out to diagnose the 41 isolates including the direct examination. The stained cells appeared as red coccobacilli under the microscope when stained with Grams Stain and the modified Ziehl – Neelsen stain . All the isolates were Ctalase , Oxidase and Urease positive while they were negative for the IMVIC test as well as for its ability to produce hydrogen sulfide.

- All the isolates showed the ability of nitrate reduction to nitrite when inoculated into nitrate reduction test medium. Two isolates out of 41 isolates (4.87%) showed weak growing ability on the macConkey agar in contrast to the rest of the isolates which were unable to.

- All the isolates were able to grow in the bacteriostatic dyes medium under the presence of basic fuchsin dye with two concentrations 1:50000 and 1:100000.

- The results of the biotyping for isolates showed that 8 isolates out of 41 isolates (19.51%) which were 2, 5 and 1 isolates of humans, goats and sheep respectively had agglutinated with monospecific antisera for Brucella abortus (A) so it was belonging to the biotype

2. While the rest 33 isolates (80.49%) which were 6, 17 and 10 isolates of humans, goats and sheep respectively had agglutinated simultaneously with monospacific antisera for Brucella abortus (A) and with monospecific antisera for Brucella melitensis (M) so it was belonging to the biotype 3.

- All isolates which were isolated from the infected cases were in the smooth phase and were greenish – blue in color when examined by light and after being colored with the crystal violet solution.

- All isolates showed its negativity to the virulence factors tests represented by the enzymes of (hemolysin, gelatin hydrolysis, lecithinase, DNAase).

- The quick standard iodide method were used for detection the β-lactamase production ability and all the isolates showed negative results.

- All isolates were subjected to the antibiotics sensitivity test toward twenty two antibiotics and they were sensitive in a rate of 100% toward Streptomycin, Pipracillin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Rifampicin, Doxycyclin and Cephoxitin while toward Chloramphenicol it was 92% and for Tetracycline and Gentamycin it was 80% for both. At the same time the isolates were resistant at a rate 100% to Ampicillin, Augmentin, Ceftriaxone, Amoxicillin, Nalidixic acid, Lincomycin, Cefixine, Penicillin G, Cloxacillin, Clindamycin, Vancomycine and the mixed Trimethoprin and Sulfamethoxazole.

- The local isolate (biotype 3) of Brucella melitensis which was isolated from one of the infected persons was chosen due to it's

highest isolation frequency rate, it's typical brucella colonial morphology and the growth speed in the extraction of the lipopolysaccharide by using the hot phenol method (concentration 90%). The Lipopolysaccharide was concentrated in the phenol phase which was precipitated by methanol reagent and then was partially purified using gel of sepharose 4B. The presence of Lipopolysaccharide particles was determined by the carbohydrate calculation using 490 nanometer. Four carbohydrate peaks, three of them are major and one is minor were noticed. Also the proteins was determined in the same way using 280 nanometer, six protein peaks were isolated, three of them were with carbohydrate group.

- Concentration of carbohydrate in raw lipopolysaccharide and the partially purified reached 55 µg/ml and 78 µg/ml respectively while the concentration of protein in the raw lipopolysaccharide and the partially purified reached 46 µg/ml and 24 µg/ml respectively. Further the concentration of lipid in the raw lipopolysaccharide and the partially purified reached 38 µg/ml and 63 µg/ml respectively.

- The results revealed the importance of using of ELISA technique for diagnosis of Brucellosis by using partially purified lipopolysaccharide from local isolate of Brucella melitensis (biotype 3) and in 10, 5, 10 µg / well of humans, goats and sheep respectively and also for the whole killed Brucella melitensis antigens for the same isolate in 40, 20 and 20 µg / well of humans, goats and sheep respectively.

- Sensitivity of the ELISA test were 100% for each humans, goats and sheep when using the partially purified lipopolysaccharide and the antigens of whole killed Brucella melitensis while the specificity of

the test by using partially purified lipopolysaccharide were 90%, 95% and 95% of humans, goats and sheep respectively. In case of the whole heat killed Brucella melitensis antigens they showed specificity of 100% for each humans, goats and sheep samples