J. of Agricultural Chemistry and Biotechnology, Vol.1 (3): 201 - 207, 2010

COMPARISION OF DIFFERENT BOVINE BLOOD CULTURE TECHNIQE FOR BACTERIOLOGICAL ISOLATION OF *Brucella melitensis*

AL-Ashkar, Buthaina [1*]; A. AL-Mariri[2] and Ibtissam Hamad[3]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences. Damascus University, Syria.

[2] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, P.O. Box 6091, Damascus, Syria.

[3] Department of Environmental Science- Damascus University- Syria

مقارنة طرق مختلفة لإستنبات دم الأبقار للعزل البكتيري للبروسيلا الضأنية

بثينة الأشقر[1]، أيمن المريري[2] و ابتسام حمد[3].

[1] قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق- سوريا.

[2] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية.

[3] قسم العلـوم البيئـية - جامعة دمشق-سوريا

الملخص

نُفذت هذه الدراسة التجريبية لمقارنة طرائق غير تجارية مختلفة لعزل البروسيلا الضأنية من عينات دموية طازجة مأخوذة من الأبقار، والتي كانت قد لُقحت بشكل تجريبي بتركيز 100 **خلية** بكتيرية CFU في مليلتر واحد من الدم. وتتضمن طرائق المقارنة الآتية: استنبات الدم بطريقة "كاستانيدا"، حل الكريات البيض والاستنبات المباشر على الآغار، حل الكريات البيض والترشيح، التثفيل باستخدام الفيكول، التثفيل باستخدام الفيكول والترشيح، التثفيل باستخدام الفيكول وحل الكريات البيض، التثفيل باستخدام الفيكول وحل الكريات البيض والترشيح.

وقد أظهرت النتائج أن تقنية حل الكريات البيض والاستنبات المباشر على الآغار أدت إلى عزل البروسيلا الضأنية خلال 48 ساعة وبنسبة استرداد بلغت الـ 57% (محسوبة من عدد الخلايا CFU الناتجة في مل واحد مقابل عدد البكتيريا الذي لقحت به عينة الدم مسبقاً). أما أزمنة العزل التي استهلكتها تقنيات استنبات الدم الأخرى، فقد تراوحت ما بين 24- 216 ساعة. وهكذا نستنتج أن تقنية حل الكريات البيض والاستنبات المباشر على الآغار من أجل عزل البروسيلا الضأنية كانت أسرع وأرخص من الطرائق الأخرى المدروسة.

كلمات مفتاحية: بروسيلا، استنبات دموي، فيكول، كريات بيضاء.

المقدمة

البروسيلا هي بكتيريا عصوية صغيرة معزولة (من 0.5 إلى 0.7 ميكرومتر)، غير متحركة ولكن لا تملك سياطاً، ولا محفظة خارجية، ولا تُشكل أبواغاً. البروسيلا هي بكتيريا سالبة الغرام، لهذا لا تتلون بملون ستام Stamp، وهي هوائية إجبارية (بعض السلالات تحتاج إلى 5-10% من غاز CO_2)، تنمو بدرجات حرارة من 20 إلى 40°، ودرجة حموضة pH المثلى لها هي 6.6-7.4، لا تستخدم السيترات، ولا تُنتج الإيندول indole (Corbel, 1997). تحوي البروسيلا على أنزيم الكاتالاز catalase وتُرجع النيترات إلى نيتريت. تظهر مستعمرات البروسيلا بعد 2-3 أيام من استنباتها على وسط *Brucella* agar، لكنها تظهر بعد 3-4 أسابيع من استنبات الدم لكن إضافة المصل على وسط الاستنبات يُحسن النمو. تكون المستعمرات صغيرة، دائرية، ملساء Smooth، أحياناً تكون خشنة Rough (Alton *et al*., 1998). يُقسم جنس البروسيلا إلى ستة أنواع، والذي يحتوي أحياناً على عدة تحت أنواع biovars، وهذا يتم تحديده اعتماداً على أساس المستنبت، وعلى الخصائص المستضدية والإستقلابية حيث يوجد: بروسيلا الضأنية *B. melitensis* (المؤلفة من ثلاث تحت أنواع)، والبروسيلا المجهضة *B. abortus* (ذات سبعة تحت أنواع)،

وبروسيلا الخنزيرية *B. suis* (ذات أربع تحت أنواع)، والبروسيلا الماعزية *B. ovis* (سلالة خشنة)، والبروسيلا الكلبية *B. canis*، وبروسيلا جرذ الصحراء *B. neotomae* (Moreno *et al*., 2002). لقد بينت دراسات تهجين DNA-DNA أنّه من المحتمل أن يكون جنس البروسيلا وحيد النوعية، كما بينت دراسات التقيد الأنزيمي XbaI لجينوم البروسيلا أنه هناك تغيرات لتحت الأنواع ضمن الجنس الواحد (Verger *et al*., 1985; Vizcaino *et al*., 2000).

يتميز داء البروسيلات بأنّه مرض معدٍ يصيب الأبقار والخنزير والماعز والكلاب والأغنام حيث يؤدي إلى الإجهاض عند الأنثى وإلى التهاب خصية عند الذكر مما يؤدي للعقم (WOH., 2004). وهذا المرض واسع الانتشار في العالم ومستوطن في بلدان البحر الأبيض المتوسط (Verger and Grayon, 1992). هناك أربعة أنواع ممرضة للإنسان: البروسيلا المجهضة، البروسيلا الضأنية، البروسيلا الخنزيرية والبروسيلا الكلبية. يمكن أن يعتبر تحديد نوع البروسيلا مؤشراً على طريقة العدوى. تُعتبر الحمى المالطية من الأمراض المهنية، حيث يكون الاحتكاك المباشر بين الحيوانات الأهلية المصابة والمربين السبب الأول للعدوى، كما يعتبر تناول الحليب الملوث ومنتجاته الطازجة من الأسباب الرئيسية للإصابة بالمرض (Kolar, 1984; Boschiroli *et al*., 2001). تنتقل العدوى للحيوان إما عن طريق التماس مع حيوان آخر مصاب أو تناول غذاء ملوث بالبكتيريا، أو دخول البكتيريا عن طريق العين أو الجلد (Smith and Ficht, 1990). لفترة طويلة من الزمن، لم يكن ممكناً الكشف عن البروسيلا، ولكن فيما بعد تم التشخيص غير المباشر لداء البروسيلات من خلال ملاحظة الأضداد في السوائل البيولوجية أو من خلال دراسة الإستجابة المناعية الخلوية الوساطة، ومن خلال العزل المباشر للبروسيلا الحية (**Al**- mariri *et al*., 2002; Allan *et al*., 1976-). وقد تبين أن الكشف عن الأضداد ضد البروسيلا، أسهل وأسرع، ومع ذلك لا ينتج جميع الحيوانات المخمجة مستويات متساوية من الأضداد يمكن ملاحظتها (Kerkhofs *et al*., 1990). من الطرائق المعتمدة للكشف عن البروسيلا، اختبارات الحساسية والاختبارات البكتيرية والاختبارات المصلية: تفاعل رايت، وردية بنغال، تثبيت المتممة، واختبار الحلقة (Fensterbank, 1982; Al Dahouk *et al*., 2003). كما استخدمت طرائق البيولوجيا الجزيئية في التنميط الجزيئي لأنواع البروسيلا مثل استخدام مورثات المرمزة لبروتينات الغشاء الخارجي (OMPs) والمورثتين IS711 و IS6501 (Cloeckaert *et al*., 1996; Roop *et al*., 1992; Vemulapalli *et al*., 1999).

تهدف دراستنا لمقارنة طرائق الاستنبات الدموية من الأبقار لعزل البروسيلا الضأنية وذلك لأن الطرائق المصلية التقليدية لا تملك حساسية ونوعية كافية لتشخيص البروسيلا لذا يجب على الباحثين إيجاد طريقة سريعة ورخيصة نسبياً وذات نوعية وحساسية 100% لتشخيص البروسيلا.

المواد والطرائق

1-الإستنبات البكتيري:

تم الحصول على البروسيلا الضأنية التي أُستخدمت في هذه الدراسة من دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية. أُستنبت البروسيلا الضأنية بدرجة 37° مئوية، على وسط الاستنبات الصلب الآتي 2YTA: آغار (20 g)، ببتون (10 g)، كلوريد الصوديوم Nacl (5 g)، خلاصة الخميرة (5 g)، ماء مقطر(1 L)؛ مضافاً إليه 5% من المصل الحصاني hours serum وبدون آغار لوسط الاستنبات السائل 2YT (Al-Mariri *et al*., 2002) .

2-حضن الدم مع البروسيلا:

تم الحصول على عينات الدم من الأبقار (خالية من البروسيلا وذلك حسب تقارير الأطباء البيطريين) بواسطة أنابيب Vacutainer التي تحوي مضاد التخثر الهيبارين. حُضنت العينات الدموية مع 100 CFU/مل لمدة ساعتين بدرجة 37° م، وذلك للسماح للبالعات الضخمة بابتلاع البكتيريا (Kenneh, 1979).

3-طرائق الاستنبات الدموي:

1.3 طريقة كاستندا (BC): تم تحضير الطور الصلب باستخدام 12 مل من الـ 2YTA بينما الطور السائل باستخدام 30 مل من الـ 2YT، ثم أُستنبت عليها 5 مل من الدم المصاب بالبروسيلا (أو بدون بروسيلا كشاهد سلبي)، وتم مشاهدة الفلاسك يومياً لمراقبة النمو البكتيري.

2.3 طريقة انحلال الكريات البيضاء واستنباتها مباشرةً (LLD): أستخدم محلول الانحلال الآتي (0.32 M سكاروز، 10 mM تريس، 1% تريتون-X100، 5 mM كلوريد المنغنزيوم، pH 7.5). وأُختبر أثر هذا المحلول على البكتيريا وذلك بحضن 100 مستعمرة بكتيرية مع 1 مل من محلول الانحلال، ثم أُستنبت على وسط 2YTA وتم تحديد التعداد البكتيري العام فلم نلاحظ أثر لمحلول الانحلال على البروسيلا الضأنية. مُزج 3 مل من دم الأبقار المصاب بالبروسيلا الضأنية مع 12 مل من محلول الانحلال لمدة 5 دقائق، ثم أُستنبت 100 µl من الناتج على وسط 2YTA، ثم حُدد التعداد البكتيري.

3.3 طريقة انحلال الكريات البيضاء واستنباتها بعد الترشيح (LLF): أُتبع نفس خطوات (2.3) مع فلترة المحلول بعد الحضن باستخدام فيلتر ذو مسامية 0.22 µM، ثم أُستنبت 100 µl من الناتج على وسط 2YTA، ثم حُدد التعداد البكتيري.

4.3 طريقة التثفيل بوجود الفيكول (FC): أستخدم الفيكول (ذو وزن جزيئي 400000) بكثافة 1.15 غ/مل. وُضع 5 مل من دم الأبقار المصاب بالبروسيلا الضأنية بأنابيب 15 مل، ثم أُضيف 10 مل من الفيكول، وثُفل المزيج 400 xg لمدة 30 دقيقة. أُستنبت 100 µl من الطبقة العلوية (الحاوية على الكريات البيضاء) على وسط الـ 2YTA.

5.3 طريقة التثفيل بوجود الفيكول والترشيح (FCF): أتبع نفس خطوات (4.3) مع فلترة الطبقة العلوية بعد التثفيل باستخدام فيلتر ذو مسامية 0.22 µM، ثم أُستنبت الفلتر على وسط 2YTA.

6.3 طريقة التثفيل بوجود الفيكول مع حل الكريات البيضاء (FLLD): أُتبع نفس خطوات (5.3) لكن مُزج 1 حجم من الكريات البيضاء مع 4 حجوم من محلول الانحلال، ثم أُستنبت 100 µl من الناتج على وسط 2YTA.

7.3 طريقة التثقيل بوجود الفيكول مع حل الكريات البيضاء مع الترشيح (FLLF): أُتبع نفس خطوات (6.3) مع فلترة الطبقة العلوية بعد مزجها بمحلول الانحلال باستخدام فيلتر ذو مسامية 0.22 µM، ثم أُستنبت الفلتر على وسط 2YTA.

النتائج والمناقشة

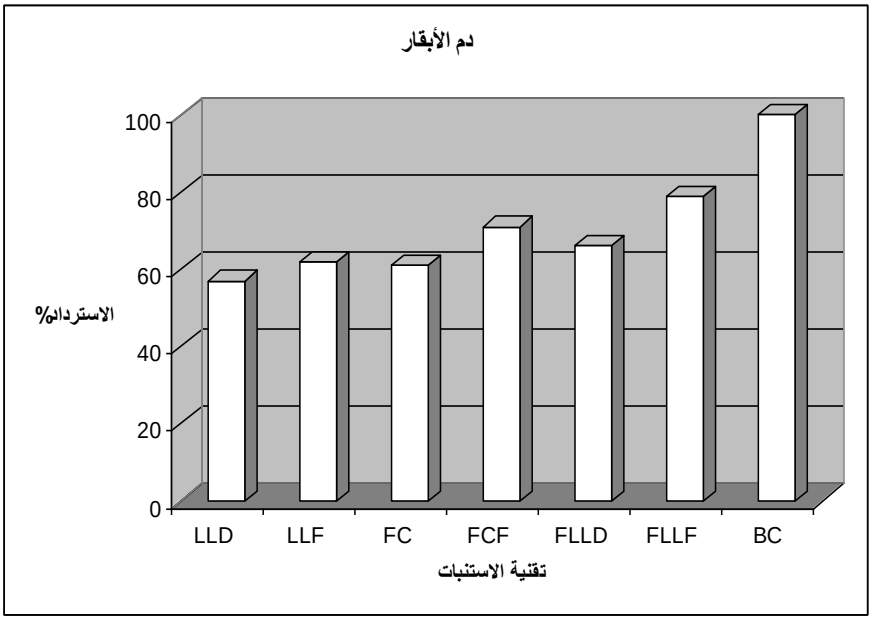
يُظهر الشكل 1 نتائج الاسترداد Recovery البكتيري لعينات دم الأبقار.

نُلاحظ من الشكل أن النسبة المئوية لاسترداد البروسيلا الضأنية بطريقة كاستندا هي 100%، بينما تراوحت النسبة المئوية للطرائق الأخرى المستخدمة بين 61% (التثفيل بوجود الفيكول) و 79% (التثفيل بوجود الفيكول مع حل الكريات البيضاء مع الترشيح).

يُلاحظ من الجدول 1 أن الوقت اللازم للكشف عن البروسيلا الضأنية في دم الأبقار بطريقة كاستندا هي حوالي 216 ساعة بينما كان الوقت 48 ساعة للطرائق الأخرى المستخدمة، وكانت النسبة المئوية للاستنبات البكتيري 100% لجميع الطرائق.

الجدول 1. الزمن المطلوب لكشف البروسيلا الضأنية من عينات دم الأبقار باستخدام طرائق طرائق الاستنبات الدموي.

الاستنبات الدموي	زمن الاستنبات	الاستنبات الموجب%
LLD	48	100
LF	48	100
FC	48	100
FCF	48	100
FLLD	48	100
FLLF	48	100
BC	192-216	100



الشكل 1. النسبة المئوية لاسترداد البروسيلا الضأنية من عينات دم الأبقار باستخدام طرائق الاستنبات الدموي.

إن زمن وكلفة الطريقة المستخدمة لتشخيص البروسيلا هام جداً وخاصةً في بلدان العالم الثالث والتي ينتشر بها داء البروسيلات لدى الحيوانات والإنسان (Almuneef and Memish, 2003; Refai, 2002; El Miedany *et al*., 2003). لُوحظ أن عدد استرداد الـ CFU/مل كان أكثر باستخدام طريقة كاستندا من الطرائق الدموية الأخرى (الشكل 1)؛ وقد يكون تفسير ذلك بخسارة جزء من البروسيلا الضأنية أثناء التجربة (مثل استخدام السيرنك، الأبرة، أنابيب التثفيل، التيبسات... الخ) بينما كان يُستنبت الدم مباشرة على وسط كاستندا (Bernhardt *et al*., 1991; Golding *et al*., 2001; Fiori *et al*., 2000). تُظهر نتائجنا أن أفضل الطرائق نسبياً للكشف عن البروسيلا الضأنية من دم الأبقار المصابة تجريبياً هي طريقة انحلال الكريات البيضاء بالترشيح (الشكل 1) واستغرقت فقط 48 ساعة (الجدول 1). ومن محاسن هذه الطريقة مقارنة مع طريقة كاستندا: العزل المبكر للبروسيلا، وتحديد التعداد البكتيري للعينة المدروسة؛ لذا نقترح استخدامها لتشخيص البروسيلا لدى الحيوانات والبشر المصابين بهذه البكتيريا (Yagupsky and Nolte, 1990; Robichaud *et al*., 2004). كما وجدنا خلال دراستنا أنه يمكن استخدام طريقة انحلال الكريات البيضاء والترشيح لتشخيص البروسيلا المزمنة لأن التعداد البكتيري يكون منخفضاً أكثر من الطور الحاد للمرض (Gill *et al*., 1984; Dornand *et al*., 2002). إن تفجير الكريات البيضاء يسمح بتحرير البروسيلا وعزلها على وسط الاستنبات 2YTA، وتوضح فيما إذا كانت البكتيريا المعزولة هي بروسيلا أم تلوث بكتيري آخر.

لوحظ أيضاً أن استخدام طريقة الفيكول مع انحلال الكريات البيضاء والترشيح ناجعة جداً للعزل البكتيري، لأنها تسمح بفصل الكريات البيضاء الحاوية على البكتيريا داخل خلوية، لكنها ذات تكلفة أعلى من طريقة انحلال الكريات البيضاء بالترشيح، كما أنها تحتاج لفني ذو خبرة باستخدام مثل هذه الطرائق (Arenas *et al*., 2000; WHO, 2004).

REFERENCES

Corbel, M. J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis*.; 3:213-321.

Alton, G. G.; L. M. Jones; R. D. Angus and J. M. Verger (1988) Bacteriological Methods, In Techniques for the brucellosis laboratory, Ed. INRA Paris France. Chp 1. 42-47.

Moreno, E.; A. Cloeckaert and I. Moriyon (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 209-227.

Verger, J. M. (1984) *Brucella*, a monospecific genus as shown by dexyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol*.; 35:292-295.

Vizcaino, N.; A. Cloeckaert; J. Verger; M. Grayon and L. Fernandez-Lago (2000) DNA polymorphism in the genus *Brucella. Microbes. Infect*.; 2:1089-1100.

WHO (2004) Brucellosis. World Health Organization Essential Medicines Library EMLib (accessed 03/12/2004). http://mednet3.who.int/eml/disease_factsheet.asp?diseaseId=274.

Verger, J. M. and Grayon, M. (1992) Presented at the Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries. *Microbes. Infect*.; 2:1089-1100.

Kolar, J. (1984) Diagnosis and control of brucellosis in small ruminants. *Prev. Vet. Med*.; 2:215-225.

Boschiroli, M. L.; V. Foulongne and D. O'Callaghan (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol*.; 4:58-64.

Smith, L. D. and T. A. Ficht (1990) Pathogenesis of *Bucella*. *Crit. Rev. Microbiol*. 17:209-230.

Al-Mariri, A.; A. Tibor; P. Lestrate; P. Mertens; X. DeBolle and J-J. Letesson (2002) *Yersinia enterocolitica* as a Vehicle for a Naked DNA Vaccine Encoding *Brucella abortus* Bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun*.; 70:1915-1923.

Allan, G. S.; R. J. Chappel; P. Williamson and D. J. MacNaught (1976) A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg*.; 76:287-298.

Kerkhofs, P.; Y. Botton; P. Thiang; P. Dekeyser and J. N. Limet (1990) Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol*.; 24:73-80.

Fensterbank; R. (1982) Le diagnostic allergique de la brucellose. *Bull. Acad. Vet. Fr*.; 55:47-52.

Al Dahouk, S.; H. Tomaso; K. Nockler; H. Neubauer and D. Frangoulidis (2003) Laboratory based diagnosis of brucellosis — a review of the literature. Part I: techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab*, 49:487-505.

Cloeckaert, A.; H. S. Debbarh; N. Vizcaino; E. Saman; G. Dubray and M. S. Zygmunt (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol. Lett*.; 140:139-144.

Roop, R. M.; M. L. Price; B. E. Dunn; S. M. Boyle; N. Sriranganathan and G. G. Schurig (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene encoding the immunoreactive *Brucella abortus* Hsp60 protein, BA60K. *Microb. Pathog*.; 12:47-62.

Vemulapalli, R.; J. R. McQuiston; G. G. Schurig; N. Sriranganathan; S. M. Halling and S. M. Boyle (1999). Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*.; 6:760-764.

Kenneh, E. S. (1979) Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils. *Infect. Immun*.; 24:932-937.

Almuneef, M. and Z. A.Memish (2003) Prevalence of *Brucella* antibodies after acute brucellosis. *J. Chemother*; 15:148-151.

Refai, M. (2002) Incidence and control of brucellosis in the near east region. *Vet Mecrobiol*., 90:81-110.

El Miedany, Y. M.; M. El Gaafary; M. Baddour and I. Ahmed (2003) Human brucellosis: do we need to revise our therapeutic policy? *J Rhematol*; 30:2666-2672.

Bernhardt, M.; D. R. Pennell; L. S. Almer and R. F. Shell (1991). Detection of bacteria in blood by centrifugation and filtration. *J. Clin. Microbiol*.; 29:422-425.

Golding, B.; D. E. Scott; O. Scharf; L. Huang; M. Zaitseva; C. Lapham; N. Eller and H. Golding (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes. Infect*.; 3:43-48.

Fiori, P. L; S. Mastrandrea; P. Rappelli and P. Cappuccinelli (2000) *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*; 38:2005-2006.

Yagupsky, P. and F. S. Nolte (1990) Quantitative aspects of septicemia. *Clin. Microbiol*. *Rev.*; 3:269-279.

Robichaud, S.; M. Libman; M. Behr and E. Rubin (2004) Prevention of laboratory-acquired brucellosis. *Clin Infect Dis*; 38:119-122.

Gill, V. J.; C. H. Zierdt; T. C.Wu; F. Stock; P. A. Pizzo and J. D. MacLowry (1984) Comparison of lysis-centrifugation with lysis-filtration and conventional unvented bottle for blood cultures. *J. Clin. Microbiol*.; 20:927-932.

Dornand, J.; A. Gross; V. Lafont; J. Liautard; J. Oliaro; J. P.Liautard (2002) The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol*; 90:383-94.

Arenasm, G. N.; A.S. Staskevich; A. Aballay and L. S. Mayorga (2000) Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun*; 68:4255-63.

COMPARISION OF DIFFERENT BOVINE BLOOD CULTURE TECHNIQE FOR BACTERIOLOGICAL ISOLATION OF *Brucella melitensis*

AL-Ashkar, Buthaina [1*]; A. AL-Mariri[2] and Ibtissam Hamad[3]

[*] Correspondance: buthaina@tigerproduction.net, Fax:11 6115433, Damascus [22222222]P.O.Box :31044

[1] Dept. of Biology, Faculty of Sciences. Damascus University, Syria.
[2] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, P.O. Box 6091, Damascus, Syria.
[3] Department of Environmental Science- Damascus University- Syria

ABSTRACT

An experimental study was carried out to compare various noncommercial methods blood culture for isolation of *Brucella melitensis* from fresh bovine blood samples that has been artificially inoculated with 100 microorganisms per ml of blood. The methods compared included the Castañeda blood culture (BC), leukocyte lysis and direct plating on agar (LLD), leukocyte lysis and filtration (LLF), Ficoll centrifugation (FC), Ficoll centrifugation and filtration (FCF), Ficoll centrifugation and leukocyte lysis (FLLD), and Ficoll centrifugation and leukocyte lysis filtration (FLLF). Results with the LLD technique showed that *B. melitensis* was isolated in 48 h, and its recovery rate was 57% (calculated from the number of CFU recovered per milliliter versus the number inoculated). The isolation times for other blood culture techniques were between 24-216 h. The LLD technique for isolation *B. melitensis* is faster and cheaper than the other methods tested.
Keywords*: Brucella,* blood culture, ficoll, leukocytes.

قام بتحكيم البحث
أ. د/ محمد منصور قاسم — **كلية الزراعة – جامعة المنصورة**
أ. د/ سمير عبد المعطى القاضي — **كلية الزراعة – جامعة كفر الشيخ**