مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(12) العدد(4)–(2012)
ISSN-1813-1646

دراسة مقارنة لأختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر في الكشف عن الاجسام المضادة لجراثيم البروسيلا لأمصال الابقار في بعض مناطق محافظة صلاح الدين

ادريس بلال علي العبدلي
كلية الطب البيطري– جامعة تكريت

الخلاصة

أستهدفت الدراسة الحالية تحديد نسبة تواجد الاجسام المضادة لجراثيم البروسيلا في أمصال ابقار غير ملقحة في مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين، وأجراء مقارنة بين أختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر. اذ تم فحص 88 عينة مصل (الشرقاط : 44 ، العلم : 15 ، تكريت: 15 ، بيجي: 14) مثلت 250 رأسا من الابقار توزعت على المناطق المختلفة للمحافظة . أظهرت نتائج اختبار وردية البنكال أن النسبة الكلية لتواجد الاضداد بلغت 11.36٪ . وسجلت أعلى نسبة في منطقة بيجي والتي بلغت 14.28 ٪، واقل نسبة سجلت 6.66 ٪في منطقة تكريت، في حين كانت النسبة الكلية لتواجد الاضداد والتي بلغت20.45 ٪، باستعمال اختبار الاليزا غير المباشر اما اعلى نسبة بلغت 26.66٪ في منطقة العلم واقل نسبة6.66 ٪ سجلت في منطقة تكريت. أظهرت النتائج أن التوافق بين نتائج الاختبارين كان قليلا اذ بلغت قيمة كابا 0.5 وهذا يدل على حساسية اختبار الاليزا غير المباشر مقارنة مع أختبار وردية البنكال في الكشف عن أضداد جراثيم البروسيلا في امصال الابقار .

الكلمات الدالة :
اختبار البنكال ، الاليزا ، البروسيلا ، الابقار

للمراسلة :
ادريس بلال علي العبدلي
كلية الطب البيطري- جامعة تكريت

الاستلام:
2011-9-15
القبول :
2012-4-25

A comparative study of Rose Bengal and indirect ELISA tests for detection of the brucella antibodies in sera of cows in some areas of Salah El-Din province

Idrees B. A. Al-abdaly
College of Veterinary Medicine- Tikrit University - Iraq

Abstract

This study was conducted to determine seroprevalence of brucellosis in non vaccinated cows in some areas of Salah EL-Din and to compare Rose Bengal and indirect ELISA tests for the detection of the brucella antibodies. A total of 88 serum samples were examined from different areas(Al-Shirgat :44 , Al-Alum ;15 , Tikrit ; 15 , Biji :14) representing 250 cows distributed in the different areas. Results of Rose Bengal test showed that the total seroprevalence of brucellosis was 11.36 ٪ and the highest rate14.28٪ in Biji, while the lowest was 11.36 ٪ in Tikrit area. Indirect ELISA test showed that the total percentage was 20.45٪, the highest 26.66٪ was reported in Al-Alum area and lowest 6.66٪ was reported in Tikrit area. The compatibility by Kappa value between the two tests was 0.5 indicating that the sensitivity of indirect ELISA test compared with Rose Bengal test in detection of brucella antibodies in cows serum .

KeyWords:
Rose Bengal and indirect ELISA tests , cows

Correspondence:
Idrees B. A. Al-abdaly
Department of Internal Medicine & Surgery & Obestetric- College of Veterinary Medicine- University - Tikrit -

Received:
15-9-2011
Accepted:
25-4-2012

المقدمة

يعد داء البروسيلات من الامراض المشتركة الواسعة الانتشار في العالم ولا يزال مستوطنا في العديد من البلدان النامية(Doganay و Aygen ، 2003) وبلدان الشرق الأوسط لان أكثر هذه البلدان تعتمد على استيراد الحيوانات من خارج المنطقة وخاصة الأبقار لأغراض الذبح والتربية وبناء المحطات الكبيرة لتربية الأبقار في الحقول التجارية الحديثة والمخصصة لمنتجات الألبان وقد بلغت نسبة الإصابة في بعض هذه الحقول 30 ٪ (Refai ، 2002) وكذلك انتشار المرض الواسع في دول البحر الابيض المتوسط الاوربية ، وسط وجنوب وشرق اسيا ، وسط وجنوب امريكا وشمال وشرق افريقيا(Pappas واخرون ، 2006) كما إن الابقار تصبح معدية في لحظة الولادة الطبيعية او المبكرة وان عددا" كبيرا" من جراثيم البروسيلا تطرح في هذه اللحظة ويقل العدد بسرعة عند اختفاء السوائل والاغشية الجنينية Nicoletti ،1980 وقد وجد إن الأبقار المصابة بهذا الداء تبقى حاملة للمرض بعد الشفاء وتكون قادرة على نقل الإصابة إلى الإنسان والحيوان ، علما" بأنها تصبح قادرة على مقاومة للمرض(Emmanuel ، 1995) . المرض يسبب خسائر اقتصادية كبيرة في الانتاج الحيواني متمثله بالاجهاض وظهور ولادات ضعيفة وفقدان الخصوبة وقلة انتاج الحليب كما يسبب المرض في بعض الاحيان نفوق الاناث البالغة ، الناتج عن التهاب بطانة الرحم الحاد واحتباس المشيمة والتاثير السلبي في الصناعات الغذائية (Silva واخرون ، 2000)، وتأتي الأهمية االصحية للمرض من خلال انتقاله إلى الإنسان بالاحتكاك المباشر مع الحيوان المصاب أو بطرائق غير مباشرة نتيجة تناول الحليب الخام ومشتقاته غير المبسترة أو استنشاق الهواء الجوي الملوث حيث إن استنشاق 10-100 جرثومة تكون كافية لإحداث المرض(Weyant واخرون ، 2001) ، وان التشخيص الدقيق للمرض يحتاج الى العزل الجرثومي ولكن بسبب بعض الصعوبات التي تواجه عزل المسبب وفشل كثير من محاولات العزل على الرغم من وجود الاصابة فقد بقيت الاختبارات المصلية هي الطريقة المعتمدة عمليا لتشخيص المرض(Garrido واخرون ، 2001) ،وان الاختبارات المصلية المستعملة في تشخيص داء البروسيلا تشخص الاضداد المتكونة ضد متعدد السكريد الشحمي الاملس الموجود في جدار الخلية الجرثومية (Munoz واخرون ، 2005) ، والاضداد المتكونة ضد بروتين الجرثومة (Delpino واخرون ، 2003) ، ومن هذه الاختبارات المستعملة للتشخيص هي اختبار وردية البنكال والتلازن الانبوبي و تثبيت المتمم واختبار الاليزا وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Muma واخرون ، 2007) .و يعد اختبار الاليزا من الاختبارات الجيدة والاكثر دقة في تحديد الاصابة بداء الربوسيلا (Nielsen ، 2002) .اجريت هذه الدراسة لتشخيص داء البروسيلا وبيان نسبة انتشارها بين الابقار في بعض مناطق محافظة صلاح الدين (الشرقاط ، العلم ، تكريت ، بيجي) ، كذلك مقارنة بين اختبار الاليزا غير المباشر واختبار وردية البنكال في الكشف عن الاضداد في الابقار .

المواد وطرائق البحث

أجريت الدراسة خلال المدة من شهر تموز 2010 ولغاية شهر نيسان 2011 واشتملت على فحص 88 عينة مصل مثلت 250 رأسا من الابقار المتوزعة في مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين (الشرقاط ، العلم ، تكريت ، بيجي) . اذ تم جمع (5 مل) من الدم من الوريد الودجي بأستعمال سرنجات معقمة ووضعت في انابيب زجاجية تركت لمدة 24 ساعة لكي يتخثر الدم ثم نبذت العينات بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة خمسة دقائق وفصل المصل ووضع في انابيب بلاستيكية معقمة وحفظت في درجة حرارة – 20º لحين اجراء الاختبارات المصلية. ثم إجري اختبار وردية البنكال على عينات المصل وحسب تعليمات الشركة الاسبانية المجهزة لعدة الاختبار (CHEMELEX) والتي تحتوي على مستضدات جرثومة البروسيلا نوع *Brucella abortus*, strain 544 ، كما وتم اجراء اختبار الاليزا غير المباشر على العينات الموجبة والسالبة في اختبار وردية البنكال وحسب تعليمات الشركة السويدية Biotech AB Svanova المجهزة لعدة الاختبار والتي تحتوي على مستضدات جرثومة *B.abortus S1119-3* or S99.

اما التحليل الإحصائي للنتائج فقد تم باستعمال البرنامج (SPSS) وأيجاد التوافق بين اختباري وردية البنكال والاليزا غير مباشرة من خلال إيجاد قيمة Kappa ، فاذا كانت قيمة Kappa = 1 فان هذا يدل على ان الاختبارين متوافقان تماما اما اذا كانت قيمة Kappa = 0 فهذا يدل على انه لا يوجد توافق بين الاختبارين(Martin ، 1977)

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج اختبار وردية البنكال على 88 عينة مصل ابقار أن النسبة الكلية لتواجد اضداد جراثيم البروسيلا في أمصال الابقار في المناطق المختلفة(الشرقاط ، العلم ، تكريت وبيجي) بلغت 11.36٪ ، اذ سجلت أعلى نسبة 14.28٪ في منطقة بيجي ، وان اقل نسبة 6.66٪ سجلت في منطقة تكريت (الجدول 1).

الجدول (1) نسب تواجد اضداد جراثيم البروسيلا بأستعمال أختبار وردية البنكال في أمصال الابقار المتوزعة في مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين

المنطقة	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية ٪ للاصابة
الشرقاط	44	5	11.36
العلم	15	2	13.33
تكريت	15	1	6.66
بيجي	14	2	14.28
المجموع الكلي	**88**	**10**	**11.36**

كما أظهرت نتأئج اختبار الاليزا غير المباشر للعينات الموجبة والسالبة لأختبار وردية البنكال ان النسبة الكلية لتواجد اضداد جراثيم البروسيلا في أمصال الابقار المتوزعة في المناطق المختلفة(الشرقاط ، العلم ، تكريت ، وبيجي) فقد بلغت 20.45 ٪ ، وسجلت كذلك أعلى نسبة للاصابة في منطقة العلم والتي بلغت 26.66٪ بينما كانت اقل نسبة للاصابة 6.66 ٪ في منطقة تكريت ((الجدول 2). أظهرت النتائج أن اختبار الاليزا غير المباشر ذو حساسية عالية مقارنة باختبار وردية البنكال،ان قيمة كابا Kappa قد بلغت 0.5 (الجدول 3).

الجدول(2) نسب تواجد اضداد جراثيم البروسيلا بأستعمال أختبار الاليزا غير المباشر في أمصال الابقار المتوزعة في مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين

المنطقة	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية ٪ للاصابة
الشرقاط	44	10	22.72
العلم	15	4	26.66
تكريت	15	1	6.66
بيجي	14	3	21.42
المجموع الكلي	88	18	20.45

الجدول (3) نتائج التحليل الاحصائي لقياس قيمة كابا Kappa value

اختبار الاليزا غير المباشر		اختبار وردية البنكال	
		عدد العينات الموجبة	عدد العينات السالبة
عدد العينات الموجبة	18	8	10*
عدد العينات السالبة	70	2**	68
المجموع	88	10	78

Kappa value = (0.5)

*سالبة كاذبة ،** موجبة كاذبة (بأعتبار ان اختبار الاليزا غير المباشر هو الادق).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأستعمال اختبار وردية البنكال أن النسبة الكلية لأنتشار اضداد جراثيم البروسيلا في امصال الابقار لمختلف مناطق محافظة صلاح الدين والتي شملت (الشرقاط ، العلم ، تكريت ، وبيجي) كانت 11.36 ٪ وجاءت هذه النسبة مختلفة عن نتائج دراسات (Rhaymah واخرون ، 2010) و(Al-Farwachi واخرون ، 2009) و(العبدلي ، 2005) و(Hadad و Jamalludeen، 1992) و (Al-Thwyni واخرون ، 2000) و(Dhahir ، 2002) و (الروضان ، 2005) التي كانت نسب الإصابة لتلك الدراسات18.25٪ و 18.3 ٪ و5.9 ٪ و 5.8٪ و24.61٪ و22.8٪ و 30٪ على التوالي وقريبة لنتيجة الدراسة (Poester ، 2003) التي كانت نسبة الاصابة فيها 15.93٪ ، ومتفقة مع نتيجة الدراسة (Hussain واخرون ، 1994) التي كانت نسبة الاصابة فيها 10.7٪ باستعمال نفس الاختبار في الابقار، وقد تعزى الاختلافات إلى ازدياد نسبة الإصابة بالمرض في بعض المناطق لعدم وجود برامج للسيطرة والحد من انتشار المرض (Hussain واخرون ، 1994) ، وقد يكون سبب الاختلاف بالنسب المئوية للاصابة بين الدراسة الحالية والدراسات الاخرى هو أن اختيار الحيوانات لم يكن عشوائيا "(Al-lzzi and و Barhoom ، 1988) أو إن بعض هذه الدراسات شملت مناطق موبوءة أو قطعان مصابة (Saleem واخرون ، 2004) بينما شملت الدراسة الحالية مناطق واسعة من محافظة صلاح الدين فضلا عن اعتمادها الاختيار العشوائي للحيوانات. ان التحليل الاحصائي لنتائج اختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر يظهر ان قيمة كابا Kappa قد بلغت 0.5 التي تقارب الصفر ، مما يدل على قلة او انعدام التوافق بين الاختبارين والسبب يعود الى وجود نتائج موجبة كاذبة او سالبة كاذبة في اختبار وردية البنكال ، كذلك قد يكون الاختلاف بسبب استعمال انواع مختلفة من المستضدات (Agasthya واخرون ، 2007) او التحضير غير الجيد للمستضد (Clavijo واخرون ، 2003) وقد يعزى التفاوت في نسب الاصابة الى كثافة التربية في مناطق دون غيرها فضلا عن وجود مناطق موبوءة وأخرى سليمة مع حرية انتقال الحيوانات المصابة بدون سيطرة او رقابة (الحنكاوي، 2006) او تكون بسبب تثبيط الكلوبولينات المناعية نتيجة استعمال المضادات الحياتية (Thrusfield ، 1986) وقد تعود الاختلافات الى التفاعلات التصالبية بين جراثيم سالبة الكرام تحتوي على متعدد سكرايد شحمي مشابه لما موجود في البروسيلا مثل جراثيم Yersinia enterocolitca O:9 (Munoz واخرون ، 2005) و (Charisis ، 1998) و (Fosgate واخرون ، 2006) . بينما اظهرت النتائج ان اعلى نسبة للاصابة كانت باستعمال اختبار الاليزا غير المباشر وقد يعود السبب الى دقته وكفاءته العالية في الكشف عن

جميع الكلوبولينات المناعية في المصل (Nielsen ، 1988) و (Quinn واخرون ، 1999) ، وكذلك تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه (الحنكاوي ، 2006) في دراسته اذ استنتج ان اختبار الاليزا غير المباشر اظهر دقة وكفاءة عالية في تشخيص داء البروسيلا مقارنة مع الاختبارات المصلية الاخرى ،

الذي وجد ان هنال حساسية ونوعية عالية لاختبار الاليزا غير المباشر، ومع نتائج (Nielsen واخرون ، 1988) الذي ذكر ان اختبار الاليزا غير المباشر يتميز بدقة وكفاءة عاليتين فضلا عن قدرته العالية في الكشف عن جميع الكلوبولينات المناعية في المصل ، ومع ما ذكره (Gall و Nielsen ، 2004) الذي سجل حساسية ونوعية اختبار الاليزا غير المباشر مقارنة مع اختبار وردية البنكال واختبارات مصلية اخرى.

شكر وتقدير

اقدم شكري وتقديري لمنتسبي المختبر المركزي في جامعة تكريت لما قدموه من تسهيلات ودعم لانجاز البحث.

المصادر

الحنكاوي ، عمر خزعل سلو(2006). دراسة مقارنة لتشخيص مرض البروسيللوسز في الضأن والماعز في محافظة نينوى بأستخدام اختبار الاليزا مع الاختبارات المصلية الاخرى . رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل .

الروضان ، محسن عبد نعمة(2005). مسح وبائي لمرض الاجهاض الساري في الابقار في الديوانية مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري ، العدد 4 : 13–17.

العبدلي، ادريس بلال علي(2005). الاصابة بالبروسيلا في محافظة نينوى وبعض الجوانب الكيمياوية الحيوية . اطروحة دكتوراه ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل.

Agasthya, A.S. ; Lsioor, S. and Prrbhudas, K. (2007) . Brucellosis in high risk group individuals.Indian J. Med. Microb. 25(1):28-30.

Al-Farwachi, M.I. ; Al-Iraqi, O.M. ; Al-Hankawe, OKh. and Abdulmajeed, M.O.(2009). Using of competitive ELISA in detection of brucella antibodies in cattle sera in Mosul city , Iraq. Iraqi J. Vet. Sci. ; 23 (2) : 97-103 .

Al-lzzi, S.A. and Barhoom , S.S. (1988). Prevalence of brucellosis among sheep and goat in Baghdad , Iraq . Iraqi J. Vet. Sci. 1(1-2) : 108-115 .

Al-Thwyni, A.;Al-Bayatti, S.; Abass, A. and Abdul–hussin ,T.(2000). A study in the epidemiological of brucellosis in some production animals in the province of Baghdad. The Veterinarian. 10(1) : 168-174.

Charisis, N. S. (1998) . Human and animal brucellosis: epidemiological Surveillance.e in the MZCP countries. Report of a WHO/MZCP workshop, Damascus, Syrian Arab Republic, 4-5 May.

Clavijo, E.; Diaz, R. ; Anguita, A. ; Garcia, A.P. ; Smits , H. L.(2003). Comparison of a dipstick assay for detection of Brucella-specif immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. Clin. Diag. Lab. Immunol. , 10(4): 612-615.

Delpino, M.V.;Cassatro, J,; Fossat, C.A. and Baldi, P.C. (2003). Antibodies to the CP24protin of *Brucella melitensis* lack diagnostic usfulness in ovine brucellosis. Vet Microbiol. 93:101-107.

Dhahir, S.H. (2002). Incidence of brucellosis in animals and man. Iraqi J. Vet. Med. 26 (2) : 140-144 .

Doganay, M. and Aygen , B. (2003). Human brucellosis : An overview. International Journal of Infectious Diseases. 7(3) : 173-182.

Emmanuel, C. (1995). Evaluation of trypanosomiasis and brucellosis control in cattle herds of Ivory coast. Agriculture, Food and Human Society. 12(20): 90-94.

Fosgate, G. T.; Adesiyun, A. A.; Hird, D. W. and Hietala, S. K.(2006). Likelihood ratio estimation without a gold standard: A case study evaluatuing a brucellosis c-ELISA in cattle and water buffalo of Trinidad. Preven. Vet. Med. , 75: 189-205.

Gall, D. and Nielsen , K. (2004) . Serological diagnosis of bovine brucellosis : A review of test performance and cost comparison. Rev. Sci. tech. Int Epiz. , 23 : 989-1002.

Garrido, F.; Duran, M.; Macmillan, A.; Minas, A.; Nicoletti, P. and Vecchi, G. (2001). Brucellosis in sheep and goat (*Br. melitensis*). European commission,Report of scientific Committee on animal health and animal welfare.

Hadad, J.J. and Jamalludeen, N.M.A. (1992) . The prevalence of brucellosis in Ninevah Province, Iraq. Iraqi J. Vet. Sci. ; 5 (2): 159-164.

Hussain, K.A. ; Saleem , A.N. and Fatoohi, F.A.M. (1994). Prevalence of brucellosis in buffaloes, cattle & sheep in Mosul region . Iraqi J. Vet. Sci . 7 (3) : 233-238 .

Martin, S.W.(1977).The evaluation of tests.Can. J. Comp.Med. : 41:19-25.

Muma, J.B.; Toft, N.; Oloya, J, ;Lund, A.; Nielsen, K. ;Samui, K.and Skjerve E.E.(2007). Valuation of three serological tests for Brucellosis in

naturally infected cattle using latent class analysis, Vet. Microbiol, 125:187-192. .

Munoz, P.M.; Martin, C.M.; Monreal, D.;Gonzalez, D.; Garin-Bastuhi, B. ;Diaz, R.; Mainar-jaime, R.; Moriyon, I. and Blasco, J.M.(2005). Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of Bovin Brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia entrocolitica* 0:9:Clinic Diag Lab. Immun. 12(1):141-151.

Nicoletti, P. (1980). The epidemiology of bovine brucellosis. Advan. In Vet. Sci. and Compar. Med. 24 : 69-98.

Nielsen , K. H. ; Wright , P. F. ; Kelly , W. A. and Cherwonogrodzky , J. H. (1988) . A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle. Vet Immunol Immunopath,; 18: 331-347.

Nielsen, K (2002). Diagnosis of brucellosis by Serology.Vet.Microbiol, 90; 447-459.

Nielsen, K.H. ; Wright , P.F. and Kelly , W.A.(1988) . Cherwonogrodzky JH. A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to Brucella abortus in cattle. Vet. Immunol. Immunopath . , 18:331-347.

Pappas ,G.; Papadimitriou, P.; Akritidis N.; Christou L.; Tsianos, E.V. (2006) .The new global map of human brucellosis. Lancet Infect.Dis. 6:91-99.

Poester, S.V.; Ramos, E.T. and Thiesen, S.V. (2003). Application of ELISA for diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande Do Sul, Braz. Centro de Pesquisa Vetrinaria Desiderio Finamor Eldorado do Sul , RS, Brazil.

Quinn , P. J. ; Carter , M. E. ; Markey , B. and Carter, G. R. (1999) . Clinical Veterinary Microbiology. 1st ed. London: Elservier;.78-79p.

Refai, M. (2002). Incidence and control of brucellosis in animals in countries of the middle east region. Vet. Microbio. 90 : 81-110.

Rhaymah, M. S. ; AL-Saad, K. A. and AL-Hankawe O. KH. (2010). Diagnosis of bovine brucellosis in Mosul city by indirect ELISA and Conventional serological tests. Iraqi J. Vet. Sci.; 4(1) : 1-6 .

Saleem, A.N.; Rhaymah, M.S. and Shamoon, G.N. (2004). Isolation and seroprevalence of ovine brucellosis. Iraqi J. vet. Sci. 18 (9) : 31-38 .

Silva, I.; Dangolla, A. and Kulachelvy,K.(2000).Seroepide-miology of *Br.abortus* infection in bovids in Sri Lanka. Pre. Vet. Med.46 : 51-59 .

Thrusfield,M. (1986) .Veterinary epidemiology. Butterworths. London.; 179-184.

Uzal, F.A. , ;Carrrascoe, A. ; Echaide , S. and Robles , C.A.( ) . Evaluation of an Indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in Patagonia, Argentina

Weyant,R.S.; Popovis,T. and Bragg,S.L.(2001).Basic Laboratory protocol for the presumptive identification of brucella species. Centers for disease control and prevention (CDC), USA.