مقارنة اختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر في الكشف عن اضداد جراثيم البروسيلا في امصال الضأن في مدينة الموصل

سامح هدايت أرسلان، خضرجاسم حسين، سلام عبد اسماعيل و صدام ظاهر حسن

فرع الطب الباطني والوقائي، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ١٦ تشرين الثاني ٢٠٠٨؛ القبول ٥ تشرين الأول ٢٠٠٩)

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية معرفة نسبة تواجد اضداد البروسيللوسز في الضأن غير الملقحة في مناطق مختلفة من مدينة الموصل، وأجراء مقارنة بين أختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر. تم فحص ٢٢٨ عينة مصل مثلت ١٩٠٦ رأسا من الضأن توزعت على عشرة قطعان. أظهرت نتائج أختبار وردية البنكال أن النسبة الكلية لتواجد اضداد البروسيللوسز كانت (٨,٧%)، أذ سجلت منطقة تلكيف أعلى نسبة (٤٠%)، ولم تسجل في مناطق الرشيدية وبازوايا والجبان أي نسب. في حين كانت النسبة الكلية لتواجد اضداد باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر (٢٣,٦%)، سجلت أعلى نسبة في منطقة النمرود (١٠٠%) واقل نسبة في بازوايا (٥,٢%). كما أظهرت النتائج أن التوافق بين الاختبارين كان قليلا اذ بلغت قيمة كابا Kappa (٠,٣٨٠) وهذا يدل على حساسية اختبار الاليزا غير المباشر مقارن مع أختبار وردية البنكال في الكشف عن اضداد البروسيلوسز في امصال الضأن.

Comparison between Rose Bengal and indirect ELISA tests for detection of the antibrucella antibodies in serum of sheep in Mosul city

S. H. Arslan, Kh. J. Hussain, S. A. Asmaeel and S. D. Hassan

Department of Internal and Preventive Medicine College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

The aim of the present study was to determine seroprevalence of brucellosis in non vaccinated sheep in different areas in Mosul city, and make a comparison between Rose Bengal and indirect ELISA tests for the diagnosis of the Brucellosis in sheep. The study included examination of 228 serum samples representing 1906 sheep distributed in ten flocks.The results of Rose Bengal test showed that total seroprevalence of brucellosis was (8.7%), being highest in Talkaf (40%), while no seroprevalence of Brucellosis was recorded in Al-Rashedia, Bazwaya and Al-Chaban areas. Using indirect ELISA test the total seroprevalence was (23.6%) and the highest percentage (100%) was in Al-Namrood area, but lowest (5.2%) in Bazwaya area. The results showed that the compatibility between the two tests was (0.380) on Kappa value which indicated that the indirect ELISA test is more sensitive when compared with Rose Bengal test in detection of antibodies of Brucellosis in serum sheep.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

يعد داء البروسللوسز من الأمراض المعدية والمشتركة التي تصيب عدد كبير من اللبائن (الأنسان، الماشية، الضأن، الماعز، الخنازير، الفوارض)، يسبب المرض الاجهاض وموت الحملان بعد الولادة وأحتباس المشيمة والتهاب المفاصل والتهاب الضرع فضلا عن العقم المؤقت أوالدائم (١-٣)، مسبب المرض في الضأن جراثيم من جنس البروسيلا من نوع *B.melitensis* و*B.ovis* (٥،٤) وذكر Ocholi (٦) أن جراثيم *B.abortus* هي اكثر تواجدا في الابقار ولكن تم عزلها من الضأن أيضا.

وللمرض انتشار عالمي واسع ويعتبرمن الامراض المتوطنة في دول البحر الابيض المتوسط والشرق الاوسط وامريكا ألاتينية وأفريقيا والهند وبعض مناطق أسيا (٧). يعتمد التشخيص الدقيق للمرض على العزل الجرثومي (٨) ولكن بسبب بطء نمو هذه الجرثومة فضلا عن عدم المقدرة على العزل الجرثومي عندما يكون المرض مزمنا او عند عودة الاصابة وحدوث الانتكاسة لهذا بقيت الاختبارات المصلية هي الطريقة المثلى لتشخيص المرض (٩) ومن الاختبارات المصلية المستخدمة هو اختبار وردية البنكال والذي يعد أختبار سهل وسريع التطبيق ويمكن الاعتماد علية كاختبار مسحي عالمي للكشف عن المرض (١٠) كما يمكن الحصول على نتائج جيدة بأستخدام اختبار الاليزا غير المباشر الذي يمتاز بالحساسية والدقة في تشخيص المرض في الضأن (١٢،١١) عليه وضعت هذه الدراسة لمعرفة نسبة تواجد اضداد البروسيللاوسز في أمصال الضأن في مناطق مختلفة من مدينة الموصل، واجراء مقارنة بين اختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر في الكشف عن اضداد المرض في أمصال الضأن.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة على ٢٢٨ عينة مصل دم مثلت ١٩٠٦ رأسا من الضأن توزعت على مناطق مختلفة من مدينة الموصل شملت (حقل كلية الزراعة والنمرود والرشيدية وتلكيف وبعشيقة وشهرزاد والجبان والحمدانية وبازوايا وكوكجلي) وللفترة من شهرأيار ٢٠٠٧ وولغاية أيار ٢٠٠٨. تم جمع (5مل) من الدم من الوريد الوداجي بأستخدام سرنجات معقمة ووضعت في أنابيب زجاجية وتركت لمدة ٢٤ ساعة لكي يتخثر الدم، ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة خمس دقائق وفصل المصل ووضع في أنابيب بلاستيكية معقمة وحفظت في درجة حرارة (-٢٠º) لحين اجراء الاختبارات المصلية. تم إجراء اختبار وردية البنكال على عينات المصل وحسب تعليمات الشركة التركية المجهزة (GÖKHAN) والذي يحتوي على المستضدات الخاص بجرثومة *B.abortus* (١٣)، كما تم اجراء اختبار الاليزا غير المباشر على العينات الموجبة والسالبه في اختبار وردية البنكال وحسب تعليمات الشركة الامريكية المجهزة (VMRD,Inc./ USA) والذي يحتوي على المستضدات الخاصة بجرثومتي *B.melitensis* و*B.abortus*. تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام برنامج SPSS 11.5 (SPSS Inc.) وأيجاد التوافق بين اختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشرة من خلال إيجاد قيمة Kappa، كلما كانت قيمة Kappa = ١ يعني الاختباران متوافقان تماما، في حين قيمة Kappa = ٠ يعني لايوجد توافق بين الاختبارين (١٤).

النتائج

تبين من خلال فحص ٢٢٨ عينة مصل دم بأستخدام اختبار وردية البنكال أن النسبة الكلية لتواجد اضداد البروسيللاوسز في أمصال الضأن في مدينة الموصل (٨,٧%)، سجلت في منطقة تلكيف أعلى نسبة (٤٠%) ولم تسجل مناطق الرشيدية وبازوايا والجبان أي نسب لتواجد الاضداد، (الجدول١).

الجدول (١) نسب تواجد اضداد البروسيللاوسز في أمصال الضأن في مناطق مختلفة من مدينة الموصل باستخدام أختبار وردية البنكال.

المنطقة	عدد القطعان	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
تلكيف	150	10	4	40
النمرود	180	20	5	25
بعشيقة	200	23	4	17.3
شهرزاد	216	25	2	8
كوكجلي	260	40	3	7.5
الحمدانية	232	25	1	4
كلية الزراعة	185	29	1	3.4
الرشيدية	120	13	0	0
بازوايا	160	19	0	0
الجبان	203	24	0	0
المجموع الكلي	1906	228	20	8.7

أظهرت نتائج الدراسة لاختبار الاليزا غير المباشر للعينات الموجبة والسالبة لأختباروردية البنكال أن النسبة الكلية لتواجد اضداد البروسيللاوسز في أمصال الضأن في مدينة الموصل (٢٣,٦%)، أذ سجلت أعلى نسبة في منطقة النمرود (١٠٠%) في حين كانت اقل نسبة في منطقة بازوايا (٥,٢%) (الجدول ٢). أوضحت النتائج أن اختبار الاليزا غير المباشر أظهر حساسية عالية مقارنة مع اختبار وردية البنكال وبلغت قيمة التوافق بين الاختبارين ٠,٣٨٠ (الجدول ٣).

المناقشة

تم في هذه الدراسة الاعتماد على أختبار وردية البنكال في الكشف عن اضداد جراثيم البروسيلا في أمصال الضأن كونه اختبار مسحي وتشخيصي فضلا عن سهولة وسرعة اجراءه ورخيص الثمن (١٥،١٦)، وكذلك على اختبار الاليزا غير المباشر كونه اختبار حساس ودقيق ويستخدم فيه أنواع مختلفة من المستضدات في تشخيص المرض في أمصال الضأن

كالنوع الخاص بجرثومة *B.melitensis* (١٧)، وتقسم المستضدات الى نوعين الاول المتكون من سلسلة متعدد السكريد الشحمي الموجود في جدار الخلية الجرثومية والثاني المتكون من بروتين الخلية (١٩،١٨).

الجدول (٢) نسب تواجد اضداد البروسيللاوسز في أمصال الضأن في مناطق مختلفة من مدينة الموصل بأستخدام أختبار الاليزا غير المباشر.

المنطقة	العدد الكلي للقطعان	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
النمرود	180	20	20	100
تلكيف	150	10	7	70
الرشيدية	120	13	4	31
بعشيقة	200	23	4	17.3
شهرزاد	216	25	4	16
كلية الزراعة	185	29	4	13.7
الجبان	203	24	3	12.5
الحمدانية	232	25	3	12
كوكجلي	260	40	4	10
بازوايا	160	19	1	5.2
المجموع الكلي	1906	228	54	23.6

الجدول (٣) مقارنة بين أختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر المستخدمة في الكشف عن اضداد البروسيللاوسز في أمصال الضأن.

اختبارالاليزا غير المباشر		اختبار وردية البنكال عدد العينات الموجبة	عدد العينات السالبة
عدد العينات الموجبة	٥٤	١٧	*٣٧
عددالعينات السالبة	١٧٤	**٣	١٧١
المجموع	٢٢٨	٢٠	٢٠٨

Kappa value (0.380)

* سالبة كاذبة، **موجبة كاذبة (على أعتبار اختبار الاليزا غير المباشر هو الادق).

بينت الدراسة أن نسبة تواجد اضداد جراثيم البروسيلا في أمصال الضأن بأستخدام أختبار وردية البنكال كانت (٨,٧%)،وجاءت هذه النسبة مقاربة لنتائج الدراسات (٢٠-٢٤) حيث كانت نسب الإصابة في الضأن لتلك الدراسات بأستخدام نفس الاختبار (٥,٥-٧,٩%)، في حين كانت النسبة أقل مقارنة مع نتائج الدراسات (٢٥-٣٠) حيث كانت نسب الإصابة وبنفس الاختبارايضا (١١,١-٢٣,٣%)، وقد يعزى الاختلاف الى اختلاف وتنوع المستضدات المستخدمة في الاختبار،فضلا عن اختلاف مناطق الدراسة واعداد الحيوانات المدروسة والى اختيار الحيوانات لم يكن عشوائيا في بعض الدراسات (١٥)، وأظهرت النتائج أن منطقة تلكيف سجلت فيها أعلى نسبة لتواجد الاضداد (٤٠%) تليها النمرود بنسبة (٢٥%) في حين لم تسجل اية نسب في مناطق الرشيدية وبازوايا والجبان باستخدام أختبار وردية البنكال، وقد يعزى التفاوت في تلك النسب إلى حرية انتقال الحيوانات بشكل عشوائي بين المناطق خاصة خلال مدة الدراسة بسبب حالة الجفاف وقلة المراعي التي شهدها البلد وخاصة محافظة نينوى، وأشار الحنكاوي (٢٩) إن التفاوت في نسب الإصابة بين المناطق المختلفة من مدينة الموصل قد يعود إلى كثافة التربية لكونها قد تختلف من منطقة إلى اخرى فضلا عن وجود مناطق موبوءة وأخرى سليمة بالإضافة الى حرية انتقال الحيوانات المصابة بدون سيطرة ورقابة.

بينت نتائج اختبار الاليزا غير المباشر على العينات الموجبة والسالبة لاختبار وردية البنكال إن الكلية لتواجد اضداد جراثيم البروسيلا في أمصال الضأن كانت (٢٣,٦%)، إذ سجلت أعلى نسبة في منطقة النمرود (١٠٠ %) تليها منطقة تلكيف بنسبة (٧٠%) في حين سجلت منطقة بازوايا أقل نسبة (٥,٢%) وهذه النسب تدل على حساسية وقدرة هذا الاختبار مقارنة مع اختبار وردية البنكال في الكشف عن الاضداد، حيث أشارBlasco (٣١) إن حساسية اختبار الاليزا غير المباشر بلغت (١٠٠%) في حين كانت حساسية اختبار وردية البنكال (٥٧%) عند إجراء دراسة مسحية لداء البروسيلا في الضأن، كما اتفقت نتائج الاختبار مع Ferreira (٣٢) حيث أشار إلى أن اختبار الاليزا غير المباشر له كفاءة تشخيصية عالية تصل الى (١٠٠%) في تشخيص المرض في الضأن مقارنة مع الاختبارات المصلية الأخرى، وأشار Al-Dahouk (٣٣) إلى إن اختبار وردية البنكال يعد من الاختبارات المسحية السهلة لتشخيص المرض ولكن يجب إن تؤكد نتائجه بفحوصات مصلية تمتاز بنوعية عالية كأختبار الاليزا والتلازن الانبوبي وتثبيت المتمم، لتجنب النتائج الموجبة والسالبة الكاذبة لاختبار وردية البنكال.

أظهرت النتائج إن التوافق بين الاختبارين كان قليلا اذ بلغت قيمة كابا Kappa (٠,٣٨٠) وهذا يدل على حساسية اختبار الاليزا غير المباشر في الكشف عن اضداد جراثيم البروسيلا في أمصال الضأن في حين أختلفت هذة النتيجة مع (٣٤) حيث سجل توافقا بين الاختبارين بلغ (٠,٧٣٠) على قيمة Kappa ويعزى الاختلاف الى ان الحيوانات المستخدمة كانت ملقحة بلقاح Rev.1.

الشكر والتقدير

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.

المصادر

1. Songer JG, Post KW,Veterinary microbiology.bacterial and fungal agents of animal disease.Elservier saunders,Missouri 2005;200-206.
2. Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Veterinary medicine, A text of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, 10th ed., W.B. Saunders Elsevier, London,2007; 966-998.
3. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis-new aspect of an old disease. J.of Applied Microbiol. 2005;98:1270-1281.
4. Gall D, Nielsen K,Vigliocco A,Smith P, Perez B, Rojas K, Robles A. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumption serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. Small Rum Res.2003;48:173-179.
5. Gupta VK, Verma DK, Singh SV, Vihan VS.Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (omp31) from *Brucella melitensis* in goats and sheep Brucellosis. Small Rum Res.2007;70:260-266.
6. Ocholi RA, Kwaga JKP, Ajogi I, Bale JOO. Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. Rev Sci Tech,off Int Epiz. 2005;24(3):973-979.
7. Boschiroli ML, Foulongue V, Ocallaghan D. Brucellosis: a world wide zoonosis. Current Opinion in Microbiology. 2001;4(1):58-64.
8. Ordun A, Almaraz A, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-pascuala A, Cuervo M, Abad R, Herandez B, Lorenzo B, Bratos MA, Rodriguez-Torres A. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucella-capt) for the serodiagnosis of human Brucellosis. J Clinic Microbiol. 2000;38:4000-4005.
9. Delpino MV, Cassataro J, Fossati CA, Baldi PC. Antibodies to the CP24 protein of *Brucella melitensis* lack diagnostic usefulness in ovine Brucellosis. Vet Microbiol. 2003;93:101-107.
10. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera JM, Martin L, Lopez-Palmero S.Rose Bengal test :diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human Brucellosis in emergency departments in endemic areas. Clin Microbiol Infect.2005;11:221-225.
11. Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Vigliocco A, Silva P, Bermudez R, Gall D, Perez B, Rojas X. enzyme immunoassay for the diagnosis of Brucellosis:chimeric protein A-protein G as a common enzyme labeled detection reagent for different animal species. Vet Microbiol. 2004;101:123-129.
12. Marin CM, Moreno E, Moriyon L, Diaz R,and Blasco JM. performance of competitive and indirect enzyme linked immunosorbent assays,gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide , and standerd serological test in diagnosis sheep Brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1999; 6:269-272.
13. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis laboratory. INRA,Paris France. 1988;63-129.
14. Martin SW. The evaluation of tests. Can J CompMed.1977;41 :19-25.
15. Agasthya AS, Lsioor S, and Prrbhudas K. Brucellosis in high risk group individuals. Indian Journal of Medical Microbiology 2007; 25(1):28-31.
16. Kortepeter M, Christopher G, Cieslak T, Culpepper R, Darling R, Pavlin J, Rowe J, MckeeJK, Eitzen JR. USA MIRIIDS Medical Mangment of Biological Casualties Hand-book4thed Maryland,USA. 2001.
17. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology 1st ed ,Elservier Ltd , London 1999;7879.
18. Abuharfeil N, Abo-Shehada MN. A Comparison between three serological test for *Brucella melitensis* infection in sheep. Tr J Vet Anim Sci. 1998;22:119-122.
19. Munoz PM, Martin CM, Monreal D, Gonzalez D, Garin-Bastuhi B, Diaz R, Mainar-jaimeR, Moriyon I, Blasco JM. Efficacy of several serological tests and antigens for dignosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia entrocolitica* 0:9:Clinic Diag Lab. Immun.2005;12(1):141-151.
20. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by Serology. Vet Microbiol 2002;90: 447-459.
21. Al-Izzi SA, Al-Bassam LS, Al-Delaimi AK. A study on ovine Brucellosis in Baghdad. Iraqi J Vet Sci 1985; 9:19-27.
٢٢. العزاوي،زيادسعدالله. دراسة مصلية وجرثومية لمرض الأجهاض المعدي (البروسيللاوسز) في الضأن و الماعز في محافظة نينوى، رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل ١٩٩٥.
٢٣. منصور،ريم سالم.دراسة وبائية وتشخيصية لمرض البروسيلا في محافظة نينوى.رسالة ماجستير،كلية الطب البيطري،جامعة الموصل٢٠٠٠.
٢٤. العبدلي،ادريس بلال علي. الاصابة بالبروسيلا في محافظة نينوى وبعض الجوانب الكيمياوية الحيوية، اطروحة دكتوراة.كلية الطب البيطري،جامعة الموصل ٢٠٠٥.
25. Al-Izzi SA, Barhoom SS. Prevalence of Brucellosis of sheep and goats in Baghdad , Iraq. Iraqi J Vet Sci1988;1(1-2):108-115.
26. Al-Thwyni A, Al-Bayatti S, Abass A, Abdul-hussin T. A study in the epidemiological of Brucellosis in some production animals in the province of Baghdad. The Veterinarian. 2000;10(1):168-174.
27. Dhahir SH. Incidence of Brucellosis in animals and man. Iraqi J Vet Med. 2002;26(2):140-144.
28. Saleem AN, Rhayma MS, ShamoonGN. Isolation and Seroprevalance of ovine Brucellosis. Iraqi J Vet Sci. 2004;18(1):31-38.
٢٩. الحنكاوي،عمر خزعل سلو. 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 ٢٠٠٦.
٣٠. الخفاجي،وسام سالم حسن. تشـخيص مرض الاجهاض السـاري (البروسيللاوسز) في الضأن بأستخدام الاختبارات المصلية مع تقيم كفاءة لقاح Rev1.، رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل ٢٠٠٨.
31. Blasco JM, Marin C, Jimenez de Bagues M, Barberan M, Hernandez A, Molina L,Velasco J, Diaz R, Moriyon I. Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. J Clin Microbiol.1994;32(8):1835-1840.
32. Ferreira AC, Cardoso R, Travassos Diaz I, Mariano I, Belo A, Rolao PI, Manteigas A, Pina FA, Correa DSM. Evaluation of a modified rose Bengal test and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Brucella melitensis* infection insheep. Vet Res.2003;34(3):397-403.
33. Al-Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D, Laboratory based diagnosis of brucellosis : overview of the literature.Part 2 : Serological tests for brucellosis. Clin Lab.2003;49:577-589.
34. Delgado S, Fernandez M, Carmenes P.Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detected of sheep infected and vaccinated with *Brucella mitensis.* J Diagn Invest.1995;7:206-209.