

الكشف عن تواجد اضرار جراثيم البروسيلا في الحملان والجداء باستخدام اختبار وردية البنكال و اختبار الاليزا غير المباشر في كوكجلي - محافظة نينوى، العراق

بشار عبد الرحمن محمد، صدام ظاهر حسن، خضر جاسم حسين و سلام عبد إسماعيل

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

(الاستلام ٢٤ كانون الأول ٢٠٠٨؛ القبول ١٣ تموز ٢٠٠٩)

الخلاصة

استهدفت الدراسة الكشف عن نسب تواجد اضرار جراثيم البروسيلا في الحملان والجداء باستخدام اختبائي وردية البنكال واختبار الاليزا غير المباشر، اذ تم جمع ١٣٥ عينة مصل (٩٥ للحملان و ٤٠ للجداء) التي كانت تعود الى اربعة قطعان. حيث أظهرت القطعان الأربعة نتائج سلبية لاختبار وردية البنكال وبنسبة صفر بالمائة، وكانت نسبة تواجد اضرار جراثيم البروسيلا باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر في اناث وذكور الحملان (29.34 % و 10 %) على التوالي وبنسبة كلية بلغت ٢٥,٣%، في حين بلغت نسبها في اناث وذكور الجداء (55 % و 0.0%) و على التوالي وبنسبة كلية بلغت ٢٧,٥%. بينت النتائج عدم وجود توافق بين الاختبارين على قيمة kappa. نستنتج من هذه الدراسة انه يمكن الاعتماد على اختبار الاليزا غير المباشر في الكشف عن تواجد اضرار جراثيم البروسيلا في الحملان والجداء كاختبار مسحي وتشخيصي بدلا من اختبار وردية البنكال.

Detection of anti brucella antibodies in lambs and goat kids using rose bengal test and indirect ELISA in Gugjeli - Ninavah province, Iraq

S. A. Esmaeel, B. A. Mohammed, S. D. Hassan and Kh. J. Hassain

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

Abstract

The object of the study was to detection of anti-brucella antibodies in lambs and goat kids by using Rose Bengal and indirect ELISA tests. Sera samples were collected from four flocks, including 135 samples (95 from lambs and 40 from goat kids). The sera examined by rose Bengal test showed negative result in all of flocks, in percentage was zero %. While the percentage of anti-brucella antibodies using indirect ELISA test in female and male lambs was (29.34 %, 10 %) respectively, with total percentage 25.3% and in female and male kids was (55 %, 0.0 %) respectively, with total percentage 27. 5%. The results showed incompatibility between rose Bengal test and indirect ELISA test with kappa value. The study concluded that indirect ELISA test can be considerable as a screening and diagnostic test instead of rose Bengal test for detection of anti-brucella antibodies in lambs and kids.

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

المقدمة

بالمرض كدول البحر الابيض المتوسط، الشرق الاوسط، افريقيا، امريكا اللاتينية واجزاء من آسيا (1). ويحدث المرض في الضان والمعز من جراء الاصابة بجراثيم تعود لجنس البروسيلا هي *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* (2)، ولهذه

يعتبر مرض البروسلوسز من الامراض المهمة التي لا يمكن السيطرة عليها بسهولة لاسيما في المناطق الموبوءة

المصل ووضع في انابيب بلاستيكية معقمة وحفظت بدرجة-20 مٌ لحين اجراء الفحوص المصلية عليه.
تم اجراء اختبار وريدية البنكال حسب تعليمات الشركة الاسبانية (CHEMELEX,S. A) المجهزة لعدة الاختبار التي تحتوي على مستضدات جرثومة *Brucella abortus*, strain 544 وحسب وصف (7).

تم اجراء اختبار الاليزا غير المباشر Indirect ELISA باستخدام المستضد الخاص (smooth lipopoly sacharride) (sLPS) لجرثومة البروسيليا نوع (*B. abortus*, *B. melitensis*) الموجودة في حفر الطبق، المجهز من قبل الشركة المنتجة لعدة الاختبار، الشركة الامريكية (VMRD, INC)، تم وضع جميع العينات والكواشف والاطباق في درجة حرارة الغرفة قبل البدء بالاختبار. ومن ثم خففت العينات باستعمال محلول التخفيف wash /diluent solution الذي يوضع في انابيب زجاجية نظيفة ومعقمة ثم ينقل جزء من عينات المصل الى تلك الانابيب بعد تخفيف العينات ينقل 100 مايكروليتر من كل انبوب الى حفر الطبق باستخدام الماصة الدقيقة، اضيفت عينة السيطرة الموجبة الى حفر الطبق A و B واضيفت عينة السيطرة السالبة الى حفر الطبق C و D، ثم يتم حضن الطبق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، بعدها تغسل حفر الطبق باستخدام محلول الغسل (التخفيف) 4 مرات بعدها يتم اضافة محلول الاقتران conjugate solution المخفف بنسبة 1:100 الى كل حفر الطبق ومن ثم تحضن لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة بعدها يغسل الطبق ثانياً باستخدام محلول الغسل wash /diluent solution 4 مرات، بعدها يتم اضافة محلول كاشف اللون substrate solution لكل حفر وتحضن لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة مع تجنب ترك الطبق تحت اشعة الشمس المباشرة، بعد ذلك يتم اضافة محلول موقف التفاعل stop solution لكل حفرة من حفر الطبق يتم قراءة النتائج مباشرة بعد اضافة محلول موقف التفاعل وعند قراءة محتويات الطبق يتم ضبط الكثافة الضوئية (OD) optical density بطول موجي 450 نانوميتر بعد تصفير جهاز المطياف الضوئي باستخدام طبق ذو حفر فارغة. تم قراءة النتائج طبقاً للشركة المجهزة لعدة الاختبار حيث تم احتساب نسبة العينة المفحوصة الى السيطرة الموجبة (SP ratio) sample / positive control وفقاً للمعادلة التالية:

الكثافة الضوئية للعينة المفحوصة -

معدل الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة

$$SP \text{ ratio} = \frac{\text{معدل الكثافة الضوئية للعينة المفحوصة}}{\text{معدل الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة}} \times 100$$

معدل الكثافة الضوئية للسيطرة الموجبة -

معدل الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة

الجرثيم القدرة على العيش والتكاثر داخل خلايا المضيف ومن ثم لها القدرة على احداث المرض مع عجز الجهاز المناعي في التغلب على المرض (3). وتأتي الأهمية الاقتصادية للمرض من خلال تسببه في حالات الاجهاض لاسيما في الثلث الاخير من الحمل فضلاً عن ظهور ولادات ضعيفة لا تستطيع العيش طويلاً مع فشل في التكاثر ونفوق اعداد كبيرة من الإناث المجهضة نتيجة احتباس المشيمة والتهاب الرحم (4). ينتقل المرض بين الحيوانات عن طريق تناول الأعلاف الملوثة وكذلك من خلال استنشاق الجراثيم من الانف وكذلك عن طريق ملتزمة العين والجروح الموجودة في الجلد (2). تبقى الجراثيم في الإفرازات الرحمية فعالة لمدة لاتقل عن شهرين بعد الولادة في اناث المعزالمصابة (5) ان إصابة الاجنة ليس من الضروري ان يؤدي الى الاجهاض حيث ان الحملان والجداء الناقلة للإصابة قد تولد حية ولكونها تكون ضعيفة وتبدو في بعض الاحيان طبيعية حيث تبقى الإصابة بشكل كامن حتى يصل الحيوان الى مرحلة النضوج الجنسي فتؤدي الى حدوث إجهاض في الحمل الاول في مثل هذه الحيوانات (6)، ولكن يمكن التخلص من هذه الإصابة اذا تم فطام المواليد بصورة مبكرة من امهاتها وابعادها عن البيئة الملوثة (5) يمكن أن تصل الإصابة إلى المواليد الحديثة عن طريق اللبن والحليب الملوث (6).

نتيجة لأهمية الإصابة المبكرة كاحد الوسائل المهمة في انتشار المرض في القطيع وبشكل كامن وعدم ظهوره ووضوحه الى ان تصل الحيوانات الإصابة لمرحلة النضوج الجنسي واقتراب مواعيد ولادتها، وضعت هذه الدراسة لمحاولة الكشف المبكر عن تواجد اضرار جراثيم البروسيليا في اناث وذكور الحملان والجداء باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر واختبار وريدية البنكال مع ايجاد قيمة التوافق بين الاختبارين.

المواد وطرائق العمل

شملت الدراسة فحص اربعة قطعان من اناث وذكور الحملان والجداء من منطقة كوكجلي (الموصل -العراق)، حيث ضم قطع اناث الحملان 750 راساً تراوحت اعمارها بين 3-6 أشهر في حين ضم قطع ذكور الحملان 200 راساً تراوحت اعمارها بين 3-7 أشهر وقطيع اناث الجداء ضم 200 راساً تراوحت اعمارها بين 3-5 أشهر في حين كان عدد قطع ذكور الجداء 200 راساً تراوحت اعمارها بين 4-6 أشهر، حيث كانت أمهاتها غير ملقحة وغير مصابة بداء البروسيلوسز.

تم جمع 5 مل من الدم مباشرة من الوريد الوداجي بواقع 10% بصورة عشوائية من كل قطع باستخدام محاقن طبية نبيذة ووضعت في انابيب زجاجية تركت لمدة 24 ساعة في الثلجة لكي يتخثر الدم، ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة خمس دقائق، تم فصل

المناقشة

تعتبر هذه الدراسة الأولى من نوعها في العراق لما تتضمنه من الكشف والتحري عن تواجد أضداد جراثيم البروسيلا في أمصال ذكور وإناث الحملان والجداء، حيث تلعب الإصابة المبكرة دوراً مهماً في نقل وانتشار داء البروسيلوسز، كذلك تكمن أهميتها في إفساح برامج السيطرة والحد من المرض لانتشارها بصورة كامنة وخفية من جيل إلى جيل في قطعان التربية. حيث بينت نتائج هذه الدراسة أن تواجد أضداد جراثيم البروسيلا وباستخدام اختبار وردية البنكال كانت صفر بالمئة في قطعان ذكور وإناث الحملان والجداء وهذه النتيجة تتوافق مع مذكره (9) حيث لم يسجل أي نتيجة موجبة باستخدام اختبار وردية البنكال عند فحصه لذكور وإناث الحملان في نيجيريا. وأثبت الباحث (10) إصابة الحملان بالبروسيلا خلال فحصه قطيع من الحملان في استراليا باستخدام اختبار تثبيت المتمم وهي بعمراً أشهر وهو اختبار جيد وأكثر كفاءة من اختبار وردية البنكال. تخالف نتائج الدراسة عما ذكره (11) حيث سجل في الموصل نسبة إصابة في الضان 7.1% وفي المعز 10.6% وعلى التوالي وكذلك (12) حيث سجل نسبة 10.6% و 65.6% في النعاج والكباش على التوالي وكذلك (13) حيث كانت نسبة الإصابة 11.8% و 8.8% في كل من الضان والمعز وعلى التوالي، وقد يعزى هذا الاختلاف إلى كون الإصابة في الحالة الأولى كامن أي إن نسبة الأجسام المناعية الموجودة في الجسم هي غير كافية للاتحاد مع المستضد (وردية البنكال) وظهور التلازم المعروف، أو بمعنى آخر أن الجهاز المناعي لم يتعرض للجراثيم المسببة للمرض بكمية كافية لإنتاج أجسام مناعية كافية لإظهار النتيجة الموجبة للاختبار. أما بالنسبة لنتائج الحيوانات البالغة قيد المقارنة فإن بلوغ الحيوانات ووصولها مرحلة التكاثر يعتبر عامل مهم لتنشيط الجراثيم المسببة للمرض (جراثيم البروسيلا) وبالذات في المراحل المتقدمة من الحمل حيث أن إفراز الأريثرينول وهو سكر كحولي من الفلقات الرحمية ينشط جراثيم البروسيلا محدثة تجرثم الدم فتكون قد وفرت مستضد يكفي لتحفيز الجهاز المناعي على إنتاج أجسام مضادة كافية لإظهار النتيجة الموجبة لاختبار وردية البنكال (14).

أما في ما يخص اختبار الاليزا غير المباشر فقد بينت الدراسة أن هذا الاختبار فعال وجيد في الكشف عن تواجد أضداد جراثيم البروسيلا حيث وجد أن نسبة تواجد أضداد جراثيم البروسيلا في الحملان الإناث كانت 29.34% وفي الحملان الذكور كانت 10%، وهذه النتيجة تتوافق مع مذكره (16,15) حيث أشار إلى نسبة الإصابة بداء البروسيلوسز تكون في الإناث أعلى مما هي عليه في الذكور. وهذا يخالف ما ذكره (13) حيث وجد أن نسبة الإصابة باستخدام هذا الاختبار كانت 15.93%، وقد يعزى هذا الاختلاف إلى عمر الحيوان وظروف

وبالاعتماد على تعليمات الشركة المجهزة أعتبرت العينات التي أعطت SP ratio أقل من ٢٥ سالبة والعينات التي أعطت SP ratio أكثر أو تساوي ٢٥ موجبة لاختبار الاليزا غير المباشر. تم تحليل النتائج احصائياً باستخدام برنامج Sps 11.5 (SPSS Inc.) لإيجاد نسبة التوافق (kappa value) بين اختبائي وردية البنكال و الاليزا غير المباشر (8).

النتائج

أوضحت نتائج الدراسة من خلال فحص عينات مصل الدم لقطعان إناث وذكور الحملان والجداء باستخدام اختبار وردية البنكال أن جميع العينات أعطت نتائج سلبية لهذا الاختبار وبنسبة صفر بالمئة الجدول (1).

كما أظهرت نتائج الفحص باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر ولنفس عينات المصل التي فحصت باستخدام اختبار وردية البنكال أن نسبة تواجد أضداد جراثيم البروسيلا في إناث الحملان (29.34%) في حين بلغت نسبة أضداد جراثيم البروسيلا في ذكور الحملان (10%) وفي إناث الجداء فقد كانت (55%) ولم تسجل أي نسبة أضداد جراثيم البروسيلا في ذكور الجداء الجدول (1).

لم يظهر التحليل الإحصائي للنتائج وجود ارتباط أو توافق بين الاختبارين الاليزا غير المباشر ووردية البنكال حيث بلغت قيمة كبا kappa value = 0.0 ولجميع القطعان.

الجدول (1) يوضح نتائج اختبار وردية البنكال واختبار الاليزا في القطعان المفحوصة.

نوع الحيوان	الجنس	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة لوردية البنكال	النسبة المئوية للإصابة	عدد العينات الموجبة لاختبار الاليزا	النسبة المئوية لاختبار الاليزا
حملان	إناث	75	0.0	0.0	22	29.34
	ذكور	20	0.0	0.0	2	10
	المجموع	95	0.0	0.0	24	25.3
جداء	إناث	20	0.0	0.0	11	55
	ذكور	20	0.0	0.0	0.0	0.0
	المجموع	40	0.0	0.0	11	27.5

المصادر

1. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbial. 2002;20:81-110.
2. Radostits OM, Gay CC, Hincheliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine: A text book of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10 th ed, Saunders Elsevier, London. 2007;966-994.
3. Fich TA. Intracellular survival of Brucella defining the link with persistence. Vet Microbial. 2003;92:213-223.
4. Adams LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the brucella genome. Vet Microbial. 2002;90:1-4:553-561.
5. Alton GG. In: Nielson K, Duncan JR, eds. Animal brucellosis. Boca Raton, FL, CRC press; 1990. 379p.
6. Grillo MJ. Transmission of *Brucella melitensis* from sheep lambs. Vet Rec. 1997;140:32:602-605.
7. Alton GG, Jones LM, Angas RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory INRA, Paris, 1988.
8. Martin SW. The evaluation of tests. Can J Com Med. 1997;41:19-25.
9. Ocholi RA, Kwaga JKP, Ajogi I, Bale JOO. Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. Rev sci tech Off Int Epiz. 2005;3:973-979.
10. Burgess GW, McDonald JW, Norris MJ. Epidemiological studies on ovine brucellosis in selected ram flocks. Australian Vet J. 2008;2(59): 45-47.
١١. منصور، ريم سالم. دراسة وبائية وتشخيصية لمرض البروسيللا في محافظة نينوى. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل 2000.
12. Saleem AN, Rhaymah MS, Shamon GN. Isolation and Seroprevalence of ovine brucellosis. Iraqi J Vet Sci. 2004;18(1):31-38.
١٣. الحنكوي، عمر خزعل سلو. دراسة مقارنة لتشخيص مرض البروسيللوس في الضان والمعز في محافظة نينوى باستخدام اختبار الاليزا مع الاختبارات المصلية الأخرى. (رسالة ماجستير)، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل؛ ٢٠٠٦.
14. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. 1 st ed Elsevier LTD. London. 1999;78-79.
15. Hussein AAA, Sayed ASM, El Feki MA. Seroepidemiological study on human brucellosis in Assiut Governorate. Egypt J Immunol 2005;12:49-56.
16. Gulaand ST, Khan A. Epidemiology and Epizootology of brucellosis: A review. Pakistan Vet J. 2007;27(3):145-151.
١٧. ارسلان، سامح هدايت، حسين، خضر جاسم، اسماعيل، سلام عبد، محمد، بشار عبدالرحمن. دراسة تشخيصية لداء البروسيللوس باستخدام اختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر في الضان في محافظة نينوى. المجلة العراقية للعلوم البيطرية؛ ٢٠٠٩: قيد النشر.
١٨. ارسلان، سامح هدايت، العبيدي، قيس طالب، الطالبي، محمد عبد المحسن، حسن، صدام ظاهر. دراسة تشخيصية لداء البروسيللوس باستخدام اختباري وردية البنكال والاليزا غير المباشر في المعز في محافظة نينوى. المجلة العراقية للعلوم البيطرية؛ ٢٠٠٩: قيد النشر.

التجربة والمكان الذي تم اخذ العينات منه. اما نسبة تواجد الاضداد الكلية باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر فقد كانت 25.3% وهذه النتيجة مقاربه لما وجده (17) عند استخدامه اختبار الاليزا غير المباشر في الضان حيث كانت 23.6%. وهي ايضاً تخالف ما اشار اليه (13) لنفس الاسباب اعلاه. اما فيما يخص المعز فقد وجد ان نسبة تواجد الاضداد في الجداء الاناث كانت 55% بينما لم يلحظ تواجد اعداد جراثيم البروسيللا باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر في الجداء الذكور، وهذا يتفق مع مذكوره (16,15) حيث اشار الى نسبة الاصابة بداء البروسيللوس تكون في الاناث اعلى مما هي عليه في الذكور. وكانت النتيجة مقاربة لما ذكره (18) عند فحصه لامصال المعز باستخدام نفس الاختبار وكانت 24.5%. وهذا يعارض ماتوصل اليه (13) اذا وجد ان نسبة الاصابة كانت 18.31%، وقد يعزى هذا الاختلاف الى عمر الحيوان حيث ان النتائج التي حصل عليها (13) كانت للحيوانات البالغة بالإضافة الى اختلاف المناطق التي اخذت منها العينات وظروف التربية. اما فيما يخص نسبة التوافق بين الاختبارين وردية البنكال والاليزا غير المباشر فقد كانت صفر بسبب كون جميع نتائج اختبار وردية البنكال كانت سالبة ولجميع القطعان.

نستنتج من هذه الدراسة أن استخدام اختبار الاليزا غير المباشر يعد ذو كفاءة عالية في الكشف عن تواجد اعداد جراثيم البروسيللا في اناث وذكور الحملان والجداء بالمقارنة مع اختبار وردية البنكال الذي لم يعطي أي نتيجة في الكشف عن هذا الاصابة لذا نوصي بالاعتماد على النتائج اعلاه في وضع برامج وخطط للسيطرة على داء البروسيللوس.

الشكر والتقدير

يتقدم الباحثون بالشكر والتقدير الى كل من ساهم في دعم هذا البحث وخاصة عمادة كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.