

تشخيص مرض الحمى القلاعية باستخدام اختبار الاليزا التنافسي غير المباشر في عجول التسمين - في منطقة الموصل

ميسر عارف عبد الحميد* و ماجد شيال رحيمه

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

(الاستلام كانون الأول ٢٠٠٨؛ القبول ١٣ تموز ٢٠٠٩)

الخلاصة

اظهر اختبار الاليزا التنافسي غير المباشر من خلال الكشف عن الأجسام المضادة للبروتين غير التركيبي في ٤٦٠ عينة مصل للحيوانات المصابة، ٤٢١ عينة موجبة بنسبة ٩١,٥% و ٣٩ عينة سالبة بنسبة ٨,٥% وبلغت حساسيته ٩١,٥% وخصوصيته ٢٨,٤%. وبينت نتائج الصورة الدموية وجود زيادة معنوية عند مستوى $P<0.05$ في العدد الكلي لخلايا الدم البيض ومعدل حجم الكرية ومعدل خضاب الكرية وفي النسبة المئوية للخلايا الحبيبية وحدث انخفاض معنوي في العدد الكلي لكريات الدم الحمر وحجم خلايا الدم المرصوصة.

Diagnosis of foot and mouth disease by indirect competitive ELISA test in feedlot calves - in Mosul province

M. A. Abd-Alhameed and M. Sh. Rhaymah

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

Abstract

Indirect competitive ELISA test used, for detection of non-structural protein (3ABC) in 460 serum samples of infected animals revealed that 421 samples were positive (91.5%) and 39 samples were negative (8.5%), with 91.5% sensitivity and 28.4% specificity. Blood picture revealed significant ($P<0.05$) increase in total leukocytic count, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and the percentage of granulocytes, and significant decrease in the total erythrocytic count and packed cell volume.

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

* البحث مستل من أطروحة الماجستير للباحث الأول

المقدمة

(3) يحدث مرض الحمى القلاعية في عجول التسمين وسلالات الأبقار المنتجة للحليب في البلدان الأوروبية وشمال أمريكا وأستراليا ويتصف بظهور علامات سريرية شديدة (4). وهناك العديد من الأنواع المصلية المسجلة في قطرنا وهي o، A، Asia وأكثرها استيطاناً هو A (5) والنوع o هو السائد (6). وفي دراسة قامت بها (7) تم عزل وتوصيف النوع o في محافظة بغداد. أشارت بعض النشرات العلمية إلى أهمية الضأن في وبائية المرض كونها من المضائف الرئيسية لانتقال المرض إلى الأبقار والخنازير (8,9) إذ تلعب المجترات الصغيرة

بعد مرض الحمى القلاعية من الأمراض الفيروسية السارية شديدة العدوى يصيب جميع الحيوانات مشفوقة الظلف بما في ذلك الحيوانات المزرعية المستأنسة والحيوانات البرية ذوات الأظلاف، ويمكن إصابة الحيوانات ذوات الخف كالجمال والفيلة (1,2) صنّف مكتب الأوبئة الدولي مرض الحمى القلاعية في القائمة (أ). وهو من الأمراض المستوطنة والمنتشرة في العديد من البلدان في القارتين الأفريقية والآسيوية وأجزاء من أمريكا

أجرى اختبار الاليزا التنافسي غير المباشر حسب تعليمات الشركة المجهزة لمواد الاختبار (شركة (SVANOVIR) السويدية).

تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام الحاسبة الالكترونية لاستخراج المعدل mean والخطأ القياسي Standard Error باستخدام برنامج (Microsoft, Ver. 11, USA).

النتائج

أظهرت نتائج الدراسة ومن خلال الكشف عن الأجسام المضادة أن العينات الموجبة للفحص ٤٢١ عينة بنسبة (٩١,٥%)، وعدد العينات التي أعطت نتائج سالبة ٣٩ عينة بنسبة (٨,٥%)، وعند النظر إلى نتائج هذا الاختبار تبين أن عدد القطعان التي أعطيت نتيجة موجبة وبنسبة ١٠٠% هي ٢٤ قطعاً أي ٢٥٩ عينة، وأعطت نتائج هذا الاختبار نسبة تراوحت بين ٩٠ - ٩٣% في ستة قطعان كان عدد العينات المفحوصة ٧٥ عينة وكان الموجب منها ٦٩ عينة وعدد العينات السالبة ٦ عينة، وبينت نتائج الاختبار أن ٦ قطعان أعطت نسبة موجبة للاختبار تراوحت بين ٨٠% - ٨٨% كان عدد العينات المفحوصة ٨٠ عينة وكان عدد العينات الموجبة ٦٦ عينة وعدد العينات السالبة ١٤ عينة. وأعطى هذا الاختبار نسبة ٧٧% في قطع واحد كان عدد العينات المأخوذة منه ١٣ عينة اظهرت ١٠ عينات نتيجة ايجابية وثلاثة عينات نتيجة سالبة تجاه هذا الاختبار. كما بينت نتائج هذا الاختبار أن قطعاً واحداً أعطى نسبة ايجابية تجاه هذا الاختبار بنسبة ٦٦,٦% أي ١٥ عينة موجباً و ٥ عينات سالبة وأعطت نتائج هذا الاختبار وبنسبة موجبة ٥٤% في قطع واحد ضم ١١ عينة مفحوصاً كان الموجب منها ٦ عينات والسالبة ٥ عينات. وأخيراً أعطى قطع واحد نسبة ايجابية ١٤% عند فحص ٧ عينات كان الموجب منها عينة واحداً والسالب ٦ عينات (الجدول ١).

كما بينت النتائج ان حساسية اختبار الاليزا في الحيوانات المصابة بمرض الحمى القلاعية كانت ٩١,٥% وكانت خصوصيته ٢٨,٤% (الجدول ٢).

بينت نتائج الدراسة للصورة الدموية للعجول المصابة بمرض الحمى القلاعية أن هناك زيادة معنوية عند مستوى $P < 0.05$ في العدد الكلي لخلايا الدم البيض ومعدل حجم الكرية ومعدل خضاب الكرية وفي النسبة المئوية للخلايا الحبيبية مقارنة مع عجول مجموعة السيطرة، وانخفاض معنوي عند مستوى $P < 0.05$ في العدد الكلي لكريات الدم الحمر وحجم خلايا الدم المرصوصة مقارنة مع مجموعة السيطرة (الجدول ٣).

(الماعز والضأن) دوراً هاماً في إدخال المرض إلى الأقطار الخالية منه بسبب صعوبة الكشف عن المرض سريرياً في تلك الحيوانات إلا أن التعرف عن وجود الفيروس (المسبب للمرض) عن طريق الاختبارات المصلية مثل اختبار الاليزا Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) واختبار التفاعل التضاعفي Polymerase Chain Reaction (PCR) ساعداً كثيراً في الكشف عن الحيوانات الحاملة للفيروس وبالتالي تطبيق برامج السيطرة واستئصال المرض (11,10). ومن الجدير بالإشارة إليه أن الاختبار المستخدم في هذه الدراسة هو اختبار الاليزا التنافسي غير المباشر (I-C ELISA) في تشخيص الأجسام المضادة ضد متعدد البروتين غير التركيبي والمسمى 3ABC، كونه يتميز عن البروتينات غير التركيبية الأخرى والبالغ عددها ستة بروتينات بسبب امتلاكه الاستضادية العالية لردود فعل الجسم تجاه تكوين الأجسام المضادة (حيث يتميز بسرعة رد فعل الجسم لتكوين الأجسام المضادة اتجاهه وبقائها لمدة طويلة (12-14)).

ونظراً للدور الهام لهذا المرض وما يسببه من خسائر اقتصادية فادحة وضعت هذه الدراسة للكشف عن نسبة انتشار مرض الحمى القلاعية باستخدام اختبار الاليزا التنافسي غير المباشر ومعرفة حساسية وخصوصية الاختبار في تشخيص المرض في قطعان عجول التسمين التي ظهرت عليها العلامات السريرية ودراسة التغيرات في المعايير الدموية للحيوانات المصابة.

المواد وطرائق العمل

تم سحب ٥ ضمت هذه الدراسة ٤٠ قطعاً لعجول محلية في منطقة كوكجلي، وكان العدد الكلي لحيوانات هذه القطعان ١٦٤١ حيواناً منها ١١٧٥ رأساً أظهرت العلامات السريرية للمرض، تم سحب الدم من الوريد الوداجي من ٤٦٠ حيواناً اظهرت العلامات السريرية للمرض (بعد تعقيم المنطقة بالكحول الايثيلي ٧٠%) والتي مضى على إصابتها خمسة عشر يوماً فأكثر من خلال المتابعة الميدانية للقطعان التي تم ادخالها للحقول. (وحسب حساسية وخصوصية الاختبار طبقاً لما ورد في (15)). كما تم سحب ٥ مل من الدم من ٧٨ حيواناً مصاباً (كانت العلامات السريرية ظاهرة عليها)، وستة عشر حيواناً سليماً من الإصابة من القطعان التي لم تظهر عليها الإصابة (عدت مجموعة سيطرة)، لدراسة التغيرات في الصورة الدموية للحيوانات المصابة ومقارنتها مع مجموعة حيوانات السيطرة، وفحصت هذه العينات باستخدام جهاز عد خلايا الدم الرقمي (Automatic Digital Cell Counter / شركة Beckman / الولايات المتحدة الأمريكية).

الجدول (٣) يبين التغيرات في الصورة الدموية للحيوانات المصابة بمرض الحمى القلاعية.

المجموعة		الصورة الدموية
عجول السيطرة	عجول المصابة	
± ٢٧,٢٤	± ١٥	العدد الكلي لخلايا الدم البيض (× ١٠ ^٣ / مايكروليتر)
* ٣,٢٦	١,٢٣	
± ٥,٦٠	± ٦,٢٤	العدد الكلي لكريات الدم الحمر (× ١٠ ^٦ / مايكروليتر)
* ٠,١١	٠,١٨	
± ٢٨,٣٧	± ٣٥,١	حجم خلايا الدم المرصوصة (%)
* ١,٤٢	٠,٦	
± ٥٢,٤٤	± ٥٠,١٥	معدل حجم الكرية (فمتوليتر)
* ٠,٨٥	٠,٠٥	
± ١٩,٣٣	± ١٨,٩٥	معدل خضاب الكرية (بيكروغرام)
* ٠,١٩	٠,٣٣	
± ٣٤,٨٢	± ٢٩,١٨	النسبة المئوية للخلايا الحبيبية (%)
* ٢,٢٥	٢,٤٩	

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي.

* تعني وجود فرق معنوي بين مجموعة السيطرة ومجموعة الحيوانات المصابة وعند مستوى احتمالية $P < 0.05$.

المناقشة

أظهرت نتائج اختبار الاليزا (اختبار المميز المناعي المرتبط بالأنزيم) في تشخيص مرض الحمى القلاعية والذي اجري على ٤٦٠ عينة مصل جمعت من عجول مضى على إصابتها مدة ١٤-٢١ يوماً، فكانت ٤٢١ عينة موجبة أي بنسبة ٩١,٥%، كذلك أعطى هذا الاختبار حساسية عالية تجاه الأضداد المتكونة ضد فيروس الحمى القلاعية في جسم العجل المصاب بلغت ٩١,٥% وخصوصية بلغت ٢٨,٤% وتختلف هذه النتائج مع ما أشار إليه (١٦) حيث سجلوا حساسية ١٠٠% وخصوصية ٩٩%. وأشار (١٧) إلى أن اختبار الاليزا التنافسي غير المباشر (المستخدم في هذه الدراسة) يمتاز بحساسية وخصوصية عاليتين وبإمكانه التمييز بين العجول المصابة و العجول الملقحة وعدم تأثره بالعوامل التي تتأثر بها الاختبارات الأخرى المستخدمة في التشخيص كاختبار المتمم، فضلاً عن عدم حدوث التلوث أثناء الاختبار كما هي الحال في اختبار معادلة الفيروس. إلا أن (١٨) سجلوا حساسية لهذا الاختبار بلغت ٧١% وخصوصية ٩٠% وعزى السبب في ذلك إلى التفاعلات غير المتخصصة مع المستضدات الأخرى التي يتعرض لها العجل المصاب وكذلك إلى اختلاف السلالات الحيوانية

الجدول (١) نتائج اختبار الاليزا في تشخيص العجول المصابة بمرض الحمى القلاعية في ٤٠ قطيعاً ظهرت عليها العلامات السريرية لمرض الحمى القلاعية.

عدد القطعان	عدد العجول في القطيع	عدد العجول التي ظهر المرض عليها	عدد النماذج المفحوصة	عدد النماذج الموجبة	عدد النماذج السالبة	النسبة المئوية
٢٤	١٠٢٥	٧٤٢	٢٥٩	٢٥٩	٠	١٠٠
٦	٢٢٢	١٣٥	٧٥	٦٩	٦	٩٣-٩٠
٦	٢٢٩	٢١٩	٨٠	٦٦	١٤	٨٨-٨٠
١	٥٠	٣٠	١٣	١٠	٣	٧٧
١	٢٥	٢٠	١٥	١٠	٥	٦٦,٦
١	٦٠	١٦	١١	٦	٥	٥٤
١	٣٠	١٣	٧	١	٦	١٤
٤٠	١٦٤١	١١٧٥	٤٦٠	٤٢١	٣٩	المجموع
						%
						٨,٥
						٩١,٥

الجدول (٢) حساسية وخصوصية اختبار الاليزا في القطعان التي ظهرت عليها العلامات السريرية لمرض الحمى القلاعية.

المجموع	الحالة الحقيقية	
	المصاب	غير المصاب
المصاب	421 (a)	1175 (b)
غير المصاب	39 (c)	466 (d)
المجموع	460 (a+c)	1641 (b+d)
المجموع	2101 (a+b+c+d)	

a: عدد العينات الموجبة لاختبار الاليزا، b: عدد العجول التي ظهر عليها المرض، c: عدد العينات السالبة لاختبار الاليزا، d: عدد العجول التي ظهر لم عليها المرض.

$$\text{الحساسية} = \frac{a}{a+c} = \frac{421}{460} = 0.915 = 91.5\%$$

$$\text{الخصوصية} = \frac{d}{b+d} = \frac{466}{1641} = 0.2839 = 28.4\%$$

5. Azab AS, Shahawy MI, Hassos EI. Detection of antibody to foot and mouth disease virus –infection associated (VIA) antigen in cattle. Sera in Nineveh Iraq. Zanco. 1987;5:2.
6. Al-Bana AS, Shony MO. Foot and mouth disease in Iraqi Native Gazella: Virus Isolation, serology and characterization. (master's thesis). Baghdad: Microbiology, college of veterinary medicine.1988.
٧. السامرائي، سوسن عبدالستار محمد (١٩٨٩). عزل وتوصيف الطفرات الحساسة للحرارة لفايروس الحمى القلاعية للنمط المصلي «٥». رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري –جامعة بغداد.
8. Kitching RP, Hughes GJ. Clinical variation in foot and mouth disease: Sheep and goats. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2002b;21:505 – 512.
9. Radostitis OM, Gay CC, Bood DC, Hinchcliff KW. Veterinary Medicine. A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, and horses. 9th ed. London: W.B. Saunders company; 2000.1059–1066p.
10. Donaldson AI, Hearps A, Alexandersen S. Evaluation of a portable "real time" PCR machine for FMD diagnosis. Vet Rec. 2001;149: 430.
11. Office International Des Epizooties (OIE). Foot and mouth disease chapter 2.1.1. in manual of standards for diagnostic test and vaccines. 4th ed. OIE, Paris. 2001;77–92p.
12. Robiolo B, Seki C, Fondevilla N, Griger P, Scodeller E, Periolo O, Torre JL, Mattion N. Analysis of the immune response to FMDv structure and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of pf liquid phase and 3ABC-ELISA tests. 2005.
13. Bergarman I, Malirat V, Neitzert E, Beck E, Panizzutti, N, Sanchez C. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot and mouth disease virus surveillance in cattle under systemic vaccination: a combined system of indirect ELISA-3ABC with an enzyme linked immuno electrotransfer blot assay. Arch Virol. 2000;145:473–489.
14. Bergmann IE, Mello AP, Neitzert E, Beck E, Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response by use of enzyme linked immuno electrotransfer blot analysis with bioengineered non-structural viral antigens. Am J Vet Res.1989;54:825.
15. Thrusfield FM. Veterinary epidemiology. 7th ed. London: Butterworths; 1986.183p.
16. Diego DM, Brocchi E, Mackay D, Simone DF. The non – structural poly protein 3ABC of foot and mouth disease as a diagnosis antigen in ELISA to differentiate infection from vaccinated cattle. Arch Virol. 1967;142:2021–2033.
17. Clavijo A, Zhou EM, Hole K, Glic B, Kitching P. Development and of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid – phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. J Virol Meth. 2004;120:217–227.
18. Brouvoort BMDC, Sorensen KJ, Anderson J, Corteyn A, Tanya VN, Kitching RP, Morgan KL. Comparison of 3ABC Enzyme linked Immunosorbant Assay for diagnosis of multiple – serotype foot and mouth disease in a cattle population in an area of endemicity. J. Clin. Microbio. 2004;42:2108-2114.
19. Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, Salt JS, Niqindi J, Mackay DKJ. Differentiation of infection from vaccination in foot and mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB, and 3ABC in ELISA using antigen expressed I baculovirus. Arch Virol.1989;143:1461–1476.
20. Coles EH. Veterinary Clinical Pathology. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1986. 10–98p.

(breeds) وأنظمة الإدارة. وسجل الباحثون (19) حساسية لهذا الاختبار بلغت ٨٨% وخصوصية ٩٩,٨% ويعود هذا الاختلاف بين هذه النتائج ونتائج الدراسة الحالية إلى أن الباحثون (19) قاموا بجمع المصل من العجول التي أصيبت تجريبياً بالمرض، حيث أشار (9) إلى أن مدة الحضانة قد تستغرق بين ١ – ٢١ يوماً وهذا ما قد يسبب تأخير في إنتاج الأضداد ضد المستضدات المحقونة وبالتالي انخفاض في حساسية الاختبار. وعند دراسة الصورة الدموية للعجول المصابة بمرض الحمى القلاعية تبين هنالك زيادة معنوية عند مستوى $P < 0.05$ في العدد الكلي لخلايا الدم البيض ومعدل حجم الكرية ومعدل خضاب الكرية وفي النسبة المئوية للخلايا الحبيبية وانخفاض معنوي في العدد الكلي لكريات الدم لحمر وحجم خلايا الدم المرصوصة، وكان فقر الدم من النوع سوى الصباغ كبير الحجم macrocytic normochromic الذي يعزى إلى الضرر الحاصل في الغدد الصماوية (endocrinopathy) (1). أما الزيادة الحاصلة في العدد الكلي لخلايا الدم البيض والتي رافقتها زيادة في عدد الخلايا الحبيبية (العدلات والحمضات والقعدات) مطابقة مع ما ورد في (20) الذي أشار إلى أن زيادة العدد الكلي للخلايا البيض مع زيادة العدلات يشير إلى حالة الإصابة الشديد مع الاستجابة الجيدة لنخاع العظم وكذلك تحصل زيادة عدد العدلات في حالة داء السكري التي عادة ما تكون من اختلاطات الإصابة بمرض الحمى القلاعية في بعض القطعان، وقد تعزى الزيادة في العدد الكلي للخلايا البيض نتيجة للإصابة الجرثومية الثانوي التي تعقب الإصابة الفيروسية.

شكر و تقدير

يشكر الباحثان عمادة كلية الطب البيطري، جامعة الموصل لدعمها الدؤوب لانجاز هذا لبحث.

المصادر

1. Gokce G, Gokce HI, Gunes V, Erdogan HM, Citil, M. Alterations in some Haematological and Biochemical parameters in cattle suffering from foot and mouth disease. Turk Vet Sci. 2004;28:723-727.
2. James AD, Rushton J. The economics of foot and mouth disease. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2002;21:637 – 644.
٣. منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (٢٠٠٦). تحضير خطط طارئة لمرض الحمى القلاعية، روما. ص ١-٦١.
4. Kitching RP. Clinical variation in foot and mouth disease: Cattles. Res Sci Tech Int Epiz.2002a;21:499 – 504.