

نسبة تواجد داء البروسيللوسز باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر في الحليب الخام في الحالات الفردية للنعاج واناث المعز في مدينة الموصل

قيس طالب العبيدي، صدام ظاهر حسن، بشار عبد الرحمن محمد وسامح هدايت أرسلان

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

(الاستلام ١ كانون الأول ٢٠٠٨؛ القبول ٢٠ أيار ٢٠٠٩)

الخلاصة

أستهدفت الدراسة الحالية معرفة نسبة تواجد اضرار البروسيللا في الحليب الخام للحالات الفردية للنعاج والمعز الوالدة (٣-٨ أسابيع من الولادة) باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر في مناطق مختلفة من مدينة الموصل، وإجراء اختبار وردية البنكال على عينات مصل الدم ولنفس القطعان. تم فحص ٢١١ عينة حليب خام مثلت ١٩٠٦ راسا من النعاج و ٨٨ عينة حليب خام مثلت ١٠٢ راسا من المعز، والتي تم الحصول عليها بشكل عشوائي من الحالات الفردية الوالدة، وتم فحص ٢١١ عينة مصل دم من الضأن و ٨٨ عينة مصل دم من المعز باستخدام اختبار وردية البنكال. أظهرت النتائج أن النسبة الكلية لعينات حليب النعاج واناث المعز الموجبة لاضداد البروسيللا هي ٦,٦% و ١١,٣% على التوالي، وكانت اعلى نسبة لها في عينات الحليب الخام للنعاج في منطقة الحمدانية (٢٠%)، و اقل نسبة موجبة في منطقة كوكجلي (٣,٣%)، ولم تسجل أي نسبة في مناطق بعشيقية وشهرزاد وبازوايا، في حين سجلت نتائج اختبار عينات الحليب الخام للمعز في منطقة النمروود أعلى نسبة لها ٢٢%، و اقل نسبة موجبة في منطقة حي العربي (٥%)، و اظهرت نتائج اختبار وردية البنكال أن النسبة الكلية للامصال الموجبة لاضداد البروسيللا في النعاج و واناث المعز كانت ٨,٥% و ٥,٨% على التوالي، نستنتج من هذه الدراسة امكانية استخدام اختبار الاليزا غير المباشر لعينات الحليب الخام في الحالات المفردة كأختبار مسحي تأكيدي للاختبارات المصلية الأخرى والتي يمكن الاعتماد عليها في تشخيص داء البروسيللوسز في النعاج والمعز الوالده.

Prevalence of brucellosis using indirect ELISA test in raw milk in individual cases of ewes and does in Mosul city

Q. T. Al-Obaidi, S. D. Hassan, B. A. Mohammad and S. H. Arslan

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

Abstract

The aim of the study was to find the prevalence of brucellosis antibodies in individual cases of ewes and goats (3-8 weeks after parturition) using indirect ELISA test in raw milk in different areas of Mosul, and using Rose Bengal test in serum samples of same flocks of sheep and goats. Examination of 211 raw milk samples represented (1906) sheep and examination of 88 raw milk samples represented 102 goats randomly collected from individual cases. The study included examination of blood sera of 211 sheep and 88 goats. The prevalence of milk samples in ewes and does positive to antibodies of brucellosis was 6.6% and 11.3%, respectively. Highest percentage was in Al-hamдания area (20%), and lowest in Googjaly area (3.3%), but non recorded in Basheka, Bazwaya and shrazad areas. Examination of raw milk of does showed the highest percentage (22%) was in Al- Namrood area, and lowest (5%) in Hay-Alarabi area. Results of Rose Bengal test in serum samples of ewes and does were 8.5% and 5.8%, respectively. It is concluded that ELISA test on raw milk in individual cases can be considered a confirmatory screening test the with the Rose Bengal test in diagnosis of brucellosis in parturated ewes and does.

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

المقدمة

الاييزا غير المباشر في الحليب بالاضافة إلى تحديد أهمية استخدام هذا الاختبار كاختبار مسحي تأكيدي مع اختبار وريدية البنكال.

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة على ٢١١ عينة من الحليب الخام التي تم الحصول عليها بشكل عشوائي من الحالات الفردية للنجاج العواسي الوالدة (بعد ٣ اسابيع - ٢ شهر) التي تراوحت اعمارها بين (٢ سنة - ٥ سنة)، مثلت ١٩٠٦ رأساً من الضأن توزعت على مناطق مختلفة من محافظة نينوى شملت (الحمداية والنمرود وتلكيف والجبان والرشيديّة وحقل كلية الزراعة وكوكجلي وبعشيقية وبازوايا وشهرزاد). وتم فحص ٨٨ عينة من الحليب الخام والتي تم الحصول عليها بشكل عشوائي ومن الحالات الفردية لأنثى لمعز المحلي الوالدة (بعد ٣ اسابيع - ٢ شهر)، والتي تراوحت اعمارها بين (٢ - ٦ سنة)، مثلت ١٠٢ رأساً من المعز توزعت على مناطق مختلفة من محافظة نينوى شملت (النمرود والرحمانية وشهرزاد وكوكجلي وبعشيقية والمثى وحي العربي)، تم جمع ٢٠ مل من الحليب الخام بعد تنظيف وتعقيم الضرع للنجاج وأنثى المعز في أنابيب اختبار بلاستيكية سعة ٢٥ مل وحفظت في (-٥٢) لحين إجراء الاختبار. تم إجراء اختبار الاييزا الغير المباشر على عينات الحليب بعد وضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة وذلك لفصل الطبقة الدهنية ونبذها، وتم إجراء الاختبار وحسب تعليمات الشركة الأمريكية المجهزة (VMRD, Inc./USA) والذي يحتوي على المستضدات لجرثومتي *B.abortus* و *B.melitensis*. كما شملت الدراسة أيضاً فحص ٢١١ عينة من مصل دم من الضأن و٨٨ عينة من مصل دم من المعز باستخدام اختبار وريدية البنكال، إذ تم جمع (٥ مل) من الدم من الوريد الوداجي باستخدام 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 (-٢٠م) لحين إجراء الاختبارات المصلية. تم إجراء اختبار وريدية البنكال على عينات المصل وحسب تعليمات الشركة التركية المجهزة (GÖKHAN) والذي يحتوي على المستضدات الخاص بجرثومة *B.abortus* (٢٠)، استغرقت انجاز البحث الفترة من شهر أيار ٢٠٠٧ ولغاية أيار ٢٠٠٨.

يعرف داء البروسيلوسز بصورة عامة بحمى البحر الأبيض المتوسط والحمى المتموجة وحمى مالطا ويعد من أهم الأمراض المشتركة التي تسببها جراثيم من جنس البروسيليا، ويلعب المرض دوراً رئيسياً في كثير من المشاكل الصحية العامة والخسائر الاقتصادية (٢،١) المتمثلة بالاجهاض وظهور ولادات ضعيفة وفقدان الخصوبة وقلة إنتاج الحليب، واحتباس المشيمة والتهاب الخصى والبربخ والتهاب المفاصل في الحيوانات المختلفة (٣) وتؤكد المشاهدات الوبائية ان على الأقل ٩٠% من الاصابات في الانسان يمكن ان تعزى الى التماس المباشر مع الحيوانات المصابة أو عن طريق استهلاك الحليب الخام أو منتجات الحليب الخام للحيوانات المصابة (٤) وتمكن الباحث zammit في عام ١٩٠٥ من ملاحظة ان مصدر الاصابة في الانسان هو عن طريق شرب حليب المعز (٥) سجل المرض في بلدان الشرق الاوسط كالاردن و المملكة العربية السعودية والعراق و سورية و ايران و مصر و بنسب اصابة مختلفة (٦-٩). ان مسبب المرض في الضأن و المعز هو جرثومة من جنس البروسيليا والتي تضم الانوع الاتية: *B.abortus* و *B.melitensis* (١٠) وتطرح الجرثومة بشكل كبير في حليب النجاج خلال الايام الاولى بعد الاجهاض حيث يمكن ان يستمر طرح الجرثومة في الحليب لمدة ٣ اسابيع وفي المعز يمكن ان يستمر طرحها في الحليب لمدة سنة أو أكثر (١١،١٢)، ويعد Schroeder أول من سجل وجود الجرثومة في الحليب في عام ١٩١٢، وقام Cooledge لأول مرة بتسجيل وجود التلازن في الحليب في عام ١٩١٦ (١٣)، ومن الاختبارات التشخيصية التي تجرى على الحليب لتشخيص المرض في المجترات هو اختبار حلقة الحليب (Milk Ring Test) ويعد من الاختبارات التي تستعمل وبشكل واسع للتحري عن الاجسام المضادة لجرثومة البروسيليا في حليب الابقار الا انه يعد اختبار غير حساس وبشكل كافي لتشخيص المرض في الضأن والمعز بسبب الاختلاف في الخصائص الفيسيولوجية بين حليب المعز وحليب الابقار (١٥،١٤) وعلى الرغم من ذلك وبسبب بساطة وسهولة إجراء الاختبار يمكن استخدامه للتحري عن الاجسام المضادة لجرثومة البروسيليا في قطعان الضأن والمعز المستخدمة لإنتاج الحليب (١٦)، وحديثاً استخدم اختبار الاييزا غير المباشر للكشف عن الاجسام المناعية في الحليب لقطعان الابقار والضأن والمعز المصابة تجريبياً بالمرض (١٧-١٩). ونظراً لقلة الابحاث التي تجرى لتشخيص داء البروسيليا عن طريق الحليب باستخدام تقنيات حديثة وضعت هذه الدراسة لمعرفة نسبة انتشار اضرار المرض في قطعان الضأن والمعز في مدينة الموصل و باستخدام اختبار

النتائج

الجدول (٢) نسبة تواجد اضرار البروسيلات في الحالات الفردية لحليب النعاج في مناطق مدينة الموصل باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر.

المنطقة	عدد عينات الحليب المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
الحمداية	٢٥	٤	٢٠ %
النمرود	٢٠	٣	١٥ %
تلكيف	١٠	١	١٠ %
الجبان	٢٤	٢	٨,٣ %
الرشيدية	١٣	١	٧,٦ %
حقل كلية الزراعة	٢٩	٢	٦,٨ %
كوكجلي	٣٠	١	٣,٣ %
بعشيقية	٢٣	٠	٠ %
بازوايا	١٢	٠	٠ %
شهرزاد	٢٥	٠	٠ %

الجدول (٣) نسبة حدوث الاصابة بداء البروسيللوسز في الحالات الفردية لحليب المعز في مناطق محافظة نينوى باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر.

المنطقة	عدد عينات الحليب المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
النمرود	٩	٢	٢٢ %
الرحمانية	١٨	٣	١٦,٦ %
شهرزاد	٨	١	١٢,٥ %
كوكجلي	٩	١	١١ %
بعشيقية	١٠	١	١٠ %
المثني	١٤	١	٧,١ %
حي العربي	٢٠	١	٥ %

كاختبار مسحي تأكيدي مع اختبار اليمرة المتسلسل PCR، وأشار Mikolon و Tittarelli (٢١،١٥) الى ان حساسية اختبار الاليزا غير المباشر في الحليب الخام للمعز تتراوح بين (٨٥-١٠٠%) في حالة الاصابة التجريبية بداء البروسيللوسز، وكانت حساسيته في الحليب الخام للضأن (٩٥%)، وأكد Vanzini (٢٢) دقة وحساسية هذا الاختبار على الحليب الخام في حالة الاصابة التجريبية بداء البروسيللوسز في الابقار حيث بلغت (٩٨,٦-٩٩,٩%). في حين أشار Bianciffiori (٢٣) الى ان استخدام اختبار الاليزا غير

اظهرت نتائج الدراسة ان النسبة الكلية لعينات الحليب الخام الموجبة لاضداد البروسيلات كانت (٦,٦% و ١١,٣%) في النعاج و اناث المعز على التوالي باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر في حين كانت النسبة باستخدام اختبار وردية البنكال على عينات مصل الدم ولنفس القطعان (٨,٥% و ٦,٨%) في النعاج والمعز على التوالي، وكانت نسبة التوافق لتواجد الاضداد في الحليب والمصل للنعاج واناث المعز (٧٧,٦% و ٦٠,١%) على التوالي، جدول (١).

الجدول (١) النسبة الكلية لتواجد اضرار البروسيللوسز في الحليب ومصل الدم في الحالات الفردية للنعاج واناث المعز باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر واختبار وردية البنكال.

انواع العينات	النعاج	اناث المعز
الحليب	٢١١/١٤	٨٨/١٠
	٦,٦%	١١,٣%
المصل	٢١١/١٨	٨٨/٦
	٨,٥%	٦,٨%
نسبة التوافق لتواجد الاضداد	٧٧,٦%	٦٠,١%

وبينت نتائج فحص عينات الحليب الخام للنعاج الوالدة أن أعلى نسبة تواجد لاضداد البروسيلات سجلت في منطقة الحمداية (٢٠%) و اقل نسبة سجلت في منطقة كوكجلي (٣,٣%) في حين لم تسجل أية نسبة في مناطق بعشيقية وشهرزاد وبازوايا، جدول (٢).

كما بينت نتائج فحص عينات الحليب الخام للمعز الوالدة أن أعلى نسبة تواجد لاضداد البروسيلات سجلت في منطقة النمرود (٢٢%)، و اقل نسبة سجلت في منطقة حي العربي (٥%)، جدول (٣).

المناقشة

اظهرت نتائج الدراسة ان النسبة الكلية للإصابة بداء البروسيللوسز في الحالات الفردية لحليب النعاج والمعز كانت (٦,٦% و ١١,٣%) على التوالي باستخدام اختبار الاليزا غير المباشر، وكانت نتائج اختبار وردية البنكال الذي أجريت على نفس قطعان الدراسة أن النسبة الكلية للإصابة في النعاج والمعز (٨,٥% و ٦,٨%) على التوالي، وهذا يبين إمكانية استخدام اختبار الاليزا غير المباشر لعينات الحليب الخام كاختبار مسحي تأكيدي لاختبار وردية البنكال للكشف عن المرض، واتفقت هذه النتيجة مع (١٩) الذي اشار الى أفضلية استخدام هذا الاختبار

8. Al-Araji AHY, Nouri KA, Tawfik MR. Neurobrucellosis: report of Iraqi patients. J. Fac. Med.1998;40(4):481-297.
9. Darwish M, Benkirane A. Field investigation of brucellosis in cattle and small ruminants in Syria.1990-1996. Rev. Sci. Tech. off Int. Epiz. 2001;20(3): 769-775.
10. Moriyon E, Moriyon I. Brucella melitensis :a nasty bug with hidden credentials for virulence , Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;99: 1-3.
11. Enright FM. The pathogenesis and pathology of Brucella infection in domestic animals. Animal Brucellosis 1990;55:301-320.
12. Stableforth AW, Galloway IA. Infectious diseases of animals: diseases due to bacteria. London , UK: Butterworths Scientific Publications 1959;1:109-119.
13. Gall D, Nielsen K, Bermudez MR, Moreno F, Smith P. Fluorescence polarization assay for detection of , Brucella abortus antibodies in bulk tank Bovine milk samples,Clinical and diagnostic laboratory immunology 2002;9,6 :1356-1360.
14. Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra AK, Poonia JS. Comparison of milk-ELISA and serum- ELISA for diagnosis of Brucella melitensis in sheep. Vet. Microbiol. 2005; 108: 305-311.
15. Mikolon AB, Gardner IA, Hielala SK, Hernandez De Anda J. Chamizo Pestana E, Hennager SG, Edmondson AJ, Evaluation of North American detection tests for diagnosis of Brucellosis in goats. J. Clin.Microbiol.1998;36(6):1716-1722.
16. Bercovich Z, Legendijk W. A modified milk ring test for detecting Brucella agglutinins in bulk tank coolers.Tijdschrift voor Diergeneeskunde1978; 103:407-416.
17. Biancifiori F, Nannini D, Di Matteo A, Belfiore P. Assessment of an indirect ELISA in milk for diagnosis of Ovine Brucellosis , Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1996;19: 17-24.
18. Funk ND, Tabatabai LB, Elzer PH, Hagius SD, Martin BM, Hoffman LJ. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of Brucella melitensis –specific antibodies in goat milk , Journal of Clinical Microbiology ,Feb. 2005;721-725.
19. Patel TJ, Kanani AN, Lata Jain ,Joshi CG, Purohit JH. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on milk samples for diagnosis of Brucellosis in bovine. Buffalo Bulletin 2008;27(2): 207-211.
20. Alton GG, Jones LM, Angus RD,and Verger JM. Techniques for the Brucellosis laboratory. INRA,Paris France 1988; 63-129.
21. Tittarelli M, Giovannin A, De Massis F, Di Ventura M, Caporale V. An indirect ELISA for the detection of antibody in milk from sheep experimentally infected with Brucella melitensis biovar 3,Veterinaria Italiana. 2006;42(2): 129-136.
22. Vanzini VR, Aguirre N, Lugaresi CI, De Echaide ST, DE Canavesio VG, Guglielmone AA, Marchesio MD, Nielsen K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine Brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. Preventive Veterinary Medicine 1998;36:211-217.
23. Biancifiori F, Coll S. Asample and direct method for identification of Brucella spp using monoclonal antibodies. Veterinaria Italiana 1994;29:8-14.

المباشر للتحري عن الاجسام المضادة للبروسيلات في حليب النعاج يمكن ان يعتبر اختبار تأكيد مناسب للحالات الفردية ولكنه يعد اختبار ذا قيمة ضعيفة في الاختبارات المسحية للقطعان المنتجة للحليب ويعزي السبب الى ان اعداد جرثومة البروسيلات في حليب الضأن الموجبة والتي تم قياسها في اللبأ والحليب وتبداء بالانخفاض بشكل سريع بعد الولادة بينما تبقى في مصل الدم وبتراكيز عالية.

ونظرا لعدم وجود دراسات مماثلة، تعد هذه الدراسة الاولى في القطر التي تشير الى امكانية استخدام اختبار الاليزا غير المباشر في الحليب كأختبار مسحي للحالات الفردية في الحيوانات الوالدة ويمكن الاعتماد عليه كاختبار تأكيد مع الاختبارات المصلية الاخرى.

الشكر والتقدير

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

المصادر

1. Abela B. Epidemiology and control of brucellosis in ruminants from 1986 to 1996 in Malta. Rev.Sci. Tech. Off. Int. Epiz.1999;18(3):649-659.
2. Eaglesome MD, Garcia MM. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. Brucella abortus ,Leptospira , Campylobacter fetus and Trichomonas fetus , Vet. Bull.1992;62(8):743-775.
3. Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff. Veterinary medicine, A text of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, 10th ed., W.B. Saunders Company ,London 2007; 966-998.
4. Baron EJ, Finegold SM. Gram-negative facultative anaerobic bacilli and aerobic coccobacilli : Brucella.In Bailey and Scotts diagnostic microbiology, 8th ed. C.V. Mosby company, Stlouis, Missouri 1990; 410-412.
5. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ. From the discovery of the Malta fever agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 2005;36:313-326.
6. Al-Ani FK, Al-Qaderi S, Hailat NQ, Razzia R, Al- Darraji AM. Human and animals Brucellosis in Jordan between 1996 and 1998 : as study. Rev.Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004; 23(3):831-840.
7. Refai M. Incidence and control of Brucellosis in the Near East region.Vet. Microbiol.2002;20:81-110.