Archive of SID

مقایسه‌ی روش‌های سرولوژیک تشخیص بروسلوز در گاومیش

بهزاد آذرکمند[۱]، مهدی پورمهدی‌بروجنی[۲*]، داریوش غریبی[۳] و مسعود قربانپور[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۴

چکیده

بروسلوز بیماری مسری و مشترک بین انسان و دام است که توسط باکتری‌های جنس بروسلا ایجاد می‌شود . این بیماری در گاومیش عمدتاً توسط *بروسلا ابورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* ایجاد می‌شود و سبب خسارت‌های اقتصادی مانند سقط، کاهش تولید شیر و کاهش باروری در حیوانات می‌شود. در این تحقیق، با مراجعه تدریجی به کشتارگاه اهواز طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ نمونه‌ی سرم ۳۲۰ رأس گاومیش کشتار شده در کشتارگاه اهواز جمع‌آوری گردید. حضور آنتی‌بادی‌های ضد بروسلا در نمونه‌های سرمی جمع‌آوری شده به وسیله‌ی دو کیت الیزای تجاری (IDEXX و ID vet) و روش‌های رایت و رزبنگال مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل با استفاده از آزمون کوکران و مک‌نمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که شیوع سرمی بروسلوز در روش رایت ۱/۵۶ درصد است. تفاوت معنی‌داری بین کیت الیزای IDEXX (P<۰/۰۰۱) و ID vet (P<۰/۰۱) با روش رزبنگال و رایت وجود داشت، اما دو کیت الیزا تفاوتی نداشتند (P>۰/۰۵). توافق بین روش رزبنگال و رایت با کیت‌های الیزای IDEXX و ID vet متوسط بود و مقدار آماره کاپا به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۴۸ محاسبه شد، اما توافق بین روش رزبنگال و رایت خیلی خوب و مقدار آماره کاپا یک بود. توافق بین کیت‌های الیزای IDEXX و ID vet خیلی خوب بود و مقدار آماره کاپا ۰/۸۶ برآورد گردید . این بررسی نشان داد که حساسیت الیزا نسبت به روش رزبنگال و رایت بیش‌تر است، اما با توجه به نحوه‌ی کنترل بیماری در ایران توصیه می‌شود که این روش با تعیین نقطه‌ی برش مخصوص به ایران طراحی و کاربردی شود.

کلمات کلیدی: بروسلوز، تشخیص، سرولوژی، گاومیش

مقدمه

بروسلوز بیماری مسری و مشترک بین انسان و دام است که توسط گونه‌های مختلف جنس بروسلا ایجاد می‌شود . گونه‌های مختلف جنس بروسلا، باکتری‌های داخل سلولی اختیاری و انگل اجباری گونه‌های مختلف دام و همچنین انسان می‌باشند. باکتری بروسلا بیش‌تر تمایل به جفت و مایعات جنینی و دستگاه تناسلی دام‌های نر و ماده دارد و عمدتاً تولیدمثل، بقای نوزادان و تولید شیر را در حیوانات مبتلا تحت تأثیر قرار می‌دهد و لذا باعث ضررهای اقتصادی زیادی در صنعت دامپروری می‌شود. گاومیش از گونه‌های دامی مهم در دنیا است که از آن به عنوان منبع تأمین کننده‌ی گوشت و شیر استفاده می‌شود. این حیوان از جمله میزبان‌های باکتری بروسلا است و بروسلوز در گاومیش به وسیله‌ی *بروسلا آبورتوس* و *ملی‌تنسیس* ایجاد می‌شود (Bryan et al. 2013, Radostits et al. 2007, Sanjrani et al. 2013). با وجود رودخانه و تالاب‌های فراوان در استان خوزستان، بستر مناسبی برای پرورش گاومیش فراهم گردیده است به طوری که این استان از مهم‌ترین قطب‌های پرورش

[۱] دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲*] دانشیار گروه بهداشت و مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: Pourmahdim@Scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

www.SID.ir

Archive of SID

گاومیش در کشور محسوب می‌شود و این حیوان در اقتصاد ساکنین این منطقه نقش مهمی دارد (نادرفرد ۱۳۸۹) . سیاست واکسیناسیون، آزمون و کشتار برای کنترل بروسلوز در گاومیش برخلاف گاو و گوسفند در کشور اجرا نمی‌شود و لذا این حیوان با توجه به مقبولیت فراوان شیر و محصولات آن در بین ساکنین استان و حتی استان‌های مجاور می‌تواند در انتقال آلودگی به انسان نقش به سزایی ایفا کند. با توجه به اهمیت بروسلوز به عنوان یک بیماری زئونوز مستقیم، ردیابی آلودگی در گاومیش استان خوزستان به روش کشت، سرولوژی و مولکولی در پژوهش‌های گذشته مد نظر قرار گرفته است (اختر دانش ۱۳۷۹، رامی ۱۳۸۸، Nowroozi-Asl et al. 2007) و اهمیت آن در اپیدمیولوژی بیماری در منطقه اثبات شده است، اما تاکنون مقایسه‌ی روش‌های سرولوژی به ویژه الیزا به عنوان یک روش سریع با حساسیت و ویژگی بالا مد نظر قرار نگرفته است، لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی برخی روش‌های سرولوژی این بیماری در گاومیش‌های کشتار شده در اهواز است تا میزان هم‌خوانی آن‌ها مشخص گردد.

مواد و روش کار

به منظور بررسی وجود آنتی‌بادی ضد بروسلا، از آذر ۹۳ تا تیر ۹۴ به روش سیستماتیک از تعداد ۳۲۰ رأس گاومیش کشتار شده در کشتارگاه اهواز، خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند و پس از گذشت مدت زمان لازم برای تشکیل لخته، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌های جدا شده به میکروتیوب‌های شماره‌گذاری شده منتقل و تا زمان انجام آزمایش سرولوژی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمایش‌های سرولوژی انجام گرفته روی نمونه‌ها شامل رزبنگال، رایت (آزمایش آگلوتیناسیون لوله) و الیزا بود. روش رزبنگال و رایت طبق منابع انجام گرفت و موارد مثبت و منفی مشخص گردید (ذوقی و همکاران ۱۳۸۳، Jagapur et al. 2013). در ادامه، تمام موارد مثبت در روش رزبنگال و رایت (۵ نمونه) و تعدادی از موارد منفی (۱۷۹ نمونه) جهت آزمایش الیزا استفاده شدند. در آزمایش الیزا از دو کیت تجاری ID vet و IDEXX استفاده گردید. کیت الیزای ID vet فرانسه بر اساس الیزای غیرمستقیم طراحی شده و در آن به عنوان آنتی‌ژن، از LPS باکتری *بروسلا آبورتوس* استفاده شده است. این کیت قادر به شناسایی آنتی‌بادی‌های تولیدی علیه *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی‌تنسیس* و *بروسلا سویس* می‌باشد. مراحل آزمایش الیزا طبق توصیه‌ی شرکت سازنده انجام گرفت و میزان جذب نوری حفره‌های پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت و ثبت گردید. طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، اگر مقدار متوسط جذب نوری کنترل مثبت بیش‌تر از ۰/۳۵۰ و نسبت مقدار متوسط جذب نوری کنترل مثبت و کنترل منفی بیش‌تر از ۳ باشد نشان‌دهنده‌ی صحت انجام الیزا است که در این صورت برای هر نمونه درصد S/P مطابق فرمول زیر محاسبه و بر اساس درصد S/P تفسیر نتایج صورت گرفت.

$$S/P\% = \frac{\text{جذب نوری کنترل منفی} - \text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل منفی} - \text{جذب نوری کنترل مثبت}} \times ۱۰۰$$

اگر مقدار S/P کم‌تر یا برابر با ۱۱۰ درصد گردید نمونه منفی در نظر گرفته شد. اگر این مقدار بین ۱۲۰-۱۱۰ درصد گردید به عنوان نمونه‌ی مشکوک تلقی گردید و اگر این مقدار بیش‌تر یا مساوی ۱۲۰ درصد گردید به عنوان نمونه‌ی مثبت در نظر گرفته شد.

کیت الیزای IDEXX بر اساس الیزای غیرمستقیم طراحی شده و در آن به عنوان آنتی‌ژن، از LPS باکتری بروسلا استفاده شده است. این کیت قادر به شناسایی آنتی‌بادی‌های تولیدی علیه باکتری بروسلا در سرم می‌باشد. مراحل آزمایش الیزا طبق توصیه‌ی شرکت سازنده انجام گرفت و میزان جذب نوری حفره‌های پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده‌ی الیزا قرائت و ثبت گردید. طبق دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت، اگر مقدار متوسط جذب نوری کنترل مثبت بیش‌تر یا مساوی

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۳۵۰ و نسبت مقدار متوسط جذب نوری کنترل مثبت و کنترل منفی بیش‌تر یا مساوی ۳ باشد نشان‌دهنده‌ی صحت انجام الیزا است که در این صورت برای هر نمونه درصد S/P مطابق فرمول ارائه شده برای کیت ID vet محاسبه گردید. تفسیر مقادیر S/P در کیت الیزای IDEXX شبیه به ID vet بود.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ به طور توصیفی و تحلیلی مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل داده‌ها با آزمون کوکران، آزمون مک‌نمار، آزمون ویلکاکسون و محاسبه آماره‌ی کاپا انجام گرفت و α=۰/۰۵ مبنای قضاوت آماری لحاظ گردید.

نتایج

شیوع سرمی بروسلوز در گاومیش به روش رایت ۱/۵۶ درصد (۵ نمونه از ۳۲۰ نمونه) و فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد ۳/۶۱-۰/۶۶ درصد بود. آزمون کوکران نشان داد تفاوت معنی‌داری بین روش‌های تشخیصی وجود دارد (P<۰/۰۰۱). توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی بروسلوز به روش رزبنگال و رایت در جدول ۱ ارائه گردیده است. بررسی چشمی این جدول نشان می‌دهد که تمام موارد مثبت در آزمایش رزبنگال در رایت نیز مثبت بودند و تمام مواردی که در آزمایش رایت منفی بودند در رزبنگال نیز منفی بودند. میزان توافق ۱۰۰ درصد و آماره کاپا برابر با ۱ بود (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱: نتایج آزمایش‌های رایت و رزبنگال در تشخیص پادتن ضدبروسلا در سرم‌های گاومیش

رایت / رزبنگال	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۵	۰	۵
منفی	۰	۱۷۹	۱۷۹
جمع	۵	۱۷۹	۱۸۴

توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی به روش رزبنگال، رایت و کیت الایزای IDEXX در جدول ۲ ارائه گردیده است. بررسی چشمی این جدول نشان می‌دهد که تمام موارد مثبت در رزبنگال یا رایت در الیزای IDEXX نیز مثبت بودند و تمام موارد منفی در الیزای IDEXX در رزبنگال یا رایت نیز منفی بودند. روش رزبنگال یا رایت با IDEXX تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱). میزان توافق ۹۳/۵ درصد و آماره کاپا برابر با ۰/۴۳ (آماره کاپا تعدیل شده برای شیوع و تورش ۰/۸۷) بود (P<۰/۰۰۱).

جدول ۲: نتایج آزمایش‌های رزبنگال، رایت و الیزای IDEXX در تشخیص پادتن ضدبروسلا در سرم‌های گاومیش

IDEXX / رزبنگال یا رایت	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۵	۰	۵
منفی	۱۲	۱۶۷	۱۷۹
جمع	۱۷	۱۶۷	۱۸۴

در جدول ۳ توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی به روش رزبنگال، رایت و کیت الیزای ID vet ارائه گردیده است. بررسی چشمی این جدول نشان می‌دهد که تمام موارد مثبت در رزبنگال یا رایت در الیزای ID vet نیز مثبت بودند و تمام موارد منفی در الیزای ID vet در رزبنگال نیز منفی بودند. روش رزبنگال یا رایت با ID vet تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۱). میزان توافق ۹۴/۶ درصد و آماره کاپا برابر با ۰/۴۸ (آماره کاپا تعدیل شده برای شیوع و تورش ۰/۸۹) بود (P<۰/۰۰۱).

جدول ۳: نتایج روش‌های رزبنگال، رایت و الیزای ID vet در تشخیص پادتن ضدبروسلا در سرم‌های گاومیش

ID vet / رزبنگال یا رایت	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۵	۰	۵
منفی	۱۰	۱۶۹	۱۷۹
جمع	۱۵	۱۶۹	۱۸۴

www.SID.ir

Archive of SID

توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی به روش کیت الیزا ID vet با IDEXX در جدول ۴ ارائه گردیده است. بررسی چشمی این جدول نشان می‌دهد که برخی موارد مثبت در الیزای IDEXX در الیزای ID vet منفی بودند و بر عکس . کیت ID vet با IDEXX تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). میزان توافق ۹۷/۸ درصد و آماره کاپا برابر با ۰/۸۶ (آماره کاپا تعدیل شده برای شیوع و تورش ۰/۹۶) بود (P<۰/۰۰۱). میانگین مقادیر S/P در کیت الیزای IDEXX و ID vet به ترتیب ۴/۹۹±۲۷/۰۱ و ۶/۲۹±۳۶/۵۹ بود که تفاوت معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۰۱).

جدول ۴: نتایج کیت‌های الیزای ID vet و IDEXX در تشخیص پادتن ضدبروسلا در سرم‌های گاومیش

IDEXX / ID vet	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۱۴	۱	۱۵
منفی	۳	۱۶۶	۱۶۹
جمع	۱۷	۱۶۷	۱۸۴

بحث

تشخیص بروسلوز به دلیل علائم بالینی متعدد و غیراختصاصی همواره نیازمند یک روش تشخیصی حساس، اختصاصی، سریع، ارزان و ساده است. اگرچه در این بیماری، کشت بهترین روش اثبات وجود بیماری است، اما روش‌های باکتری‌شناسی زمان بر بوده و در موارد تحت حاد و مزمن با موارد منفی کاذب فراوان همراه است، لذا ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش تشخیص بروسلوز آزمایش‌های سرولوژیک است . مسلماً برای استفاده از یک روش تشخیصی بایستی از اعتبار و اعتماد آن مطلع بود (انصاری‌نیا و همکاران ۱۳۹۲).

در بررسی حاضر، روش‌های سرولوژیک رایت، رزبنگال و الیزا در تشخیص بروسلوز گاومیش مقایسه شدند. مقایسه‌ی روش‌های تشخیصی در انتخاب بهترین روش و ارزیابی نتایج آن‌ها حائز اهمیت است. با انجام آزمون‌های ذکر شده مشخص شد که آزمایش الیزا به طور معنی‌داری حساسیت بیش‌تری نسبت به آزمایش رزبنگال و رایت در تشخیص بروسلوز در گاومیش دارند. در واقع آزمایش رزبنگال و رایت تعداد موارد منفی کاذب بیش‌تری نسبت به آزمایش الیزا داشتند. همچنین دو کیت الیزای تجاری استفاده شده نیز حساسیت یکسانی نداشتند. در توجیه این امر می‌توان گفت در کشورهای اروپایی کنترل بروسلوز از طریق روش بهداشتی یعنی عدم استفاده از واکسن و حذف موارد مثبت در آزمون انجام می‌گیرد، اما در کشور ما کنترل از طریق روش دارویی یعنی استفاده از واکسن، آزمون و کشتار موارد مثبت در گاو و گوسفند انجام می‌گیرد، لذا در کشورهای اروپایی کیت‌های الیزایی طراحی و وارد بازار می‌شود که بسیار حساس هستند زیرا نقطه‌ی برش را پایین در نظر گرفته‌اند تا مقادیر کم آنتی‌بادی را ردیابی نمایند و موارد مثبت و حتی مشکوک را تشخیص و حذف نمایند. البته نبایستی از واکنش متقاطع در آزمون الیزا به علت استفاده از لیپوپلی ساکارید باکتری بروسلا غافل و مشابهت آن با برخی از عوامل باکتریایی دیگر غافل بود.

همسو با بررسی حاضر Jagapur و همکاران در سال ۲۰۱۳ در هند با مطالعه روی سرم گاوها نشان دادند که آزمون الیزا حسایت بالایی نسبت به رزبنگال و رایت دارد و در تیترهای پایین از آن می‌توان در تست غربالگری استفاده کرد همچنین Ahouran و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مطالعه روی سرم گاوها نشان دادند آزمون الیزای غیرمستقیم دارای حساسیت بالاتری نسبت به روش رایت و ۲- مرکاپتواتانول است.

اختردانش در سال ۱۳۷۹ بررسی سرولوژیک و باکتریولوژیک بروسلوز در گاومیش‌های ماده‌ی کشتار شده در کشتارگاه اهواز را انجام داد و نشان داد که میزان آلودگی در آزمایش رزبنگال ۱۷ درصد و در آزمایش رایت و ۲- مرکاپتواتانول ۱۴ درصد است. ضمناً نشان داد بین روش‌های تشخیصی اختلافی وجود ندارد. رامی

www.SID.ir

Archive of SID

در سال ۱۳۸۸ آلودگی بروسلایی گاومیش‌های کشتار شده در کشتارگاه اهواز را با استفاده از روش کشت و PCR بررسی نمود. در این بررسی خون و غدد لنفاوی پستان یا بیضه حیواناتی که در روش رزبنگال، رایت و ۲ مرکاپتواتانول مثبت بودند از لحاظ کشت و PCR بررسی شدند. در مجموع ۳ درصد گاومیش‌ها در آزمایشات سرولوژی مثبت بودند که از این تعداد، از یک مورد باکتری جدا شد و دو مورد نیز در PCR مثبت شدند. Nowroozi-Asl و همکاران در سال ۲۰۰۷ شیوع بروسلوز در گاومیش در استان خوزستان را به روش رزبنگال، آگلوتیناسیون و ۲- مرکاپتواتانول به ترتیب ۲۰/۵، ۱۹/۵ و ۱۱ درصد گزارش نمودند که همانند مطالعه‌ی حاضر حساسیت روش رزبنگال و آگلوتیناسیون تقریباً یکسان است.

Rahman و همکاران در سال ۲۰۱۲ شیوع سرمی بروسلوز را در گاومیش در بنگلادش به روش رزبنگال، آگلوتیناسیون داخل لوله و الیزا به ترتیب ۲/۹، ۱/۴۸ و ۱/۴۸ درصد گزارش کردند که نتایج شیوع سرمی با این سه روش شباهت نزدیکی به هم داشتند، اما Munir و همکاران در سال ۲۰۱۱ شیوع سرمی بروسلوز به روش رزبنگال و الیزا را به ترتیب در گاومیش ۸ و ۱۵/۲ و در گاو ۶/۵ و ۸ درصد گزارش کردند که دو روش تشخیصی در گاومیش برخلاف گاو تفاوت بارزی دارند که همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر است.

مرشدی و همکاران در سال ۱۳۸۹ ارزیابی آزمون PCR در تشخیص بروسلوز گاوها و مقایسه‌ی آن با روش‌های سرولوژیک رزبنگال و رایت را انجام دادند و نشان دادند که روش مولکولی با رایت ۵۵ درصد همخوانی دارد. Mahajan و همکاران در سال ۲۰۱۱ روش رزبنگال، حلقه‌ای شیر و رایت را در گاومیش مقایسه نمودند و نشان دادند که توافق آزمون رزبنگال و حلقه‌ای شیر با رایت به ترتیب ۹۶/۰۷ و ۸۰/۸۹ درصد است. حساسیت آزمون رزبنگال و حلقه‌ای شیر ۱۰۰ درصد و ویژگی این دو روش به ترتیب ۹۵/۴۵ و ۷۷/۲۷ درصد گزارش گردید. ارزش اخباری مثبت آزمون رزبنگال و حلقه‌ای شیر به ترتیب ۰/۷۷۸ و ۰/۴۱۲ بود و آماره کاپا بین رزبنگال و حلقه‌ای شیر با رایت ۰/۸۵۲ و ۰/۴۹۳ بود. Patel و همکاران در سال ۲۰۱۱ شیوع سرمی بروسلوز را با استفاده از آزمایش رزبنگال و الایزای غیرمستقیم در گاومیش به ترتیب ۰/۹۵ و ۲/۸۵ درصد گزارش کردند.

Ramadan و همکاران در سال ۲۰۱۳ شیوع سرمی بروسلوز را در گاومیش در مصر با روش‌های رزبنگال، آگلوتیناسیون در لوله، روش تغییر یافته آگلوتیناسیون در لوله، آزمایش ریوانول و ایمونوکروماتوگرافی بررسی و مقایسه کردند و ضمن تعیین شیوع سرمی بروسلوز در نواحی مختلف با روش‌های مختلف، نتیجه گرفتند تفسیر نتایج روش تغییر یافته آگلوتیناسیون در لوله از روش معمول آگلوتیناسیون در لوله ساده‌تر است. Suazo-Cortez و همکاران در سال ۲۰۱۲ شیوع سرمی بروسلوز را در گاومیش در مکزیک به روش اسلاید و ریوانول بررسی کردند و شیوع آن را در روش اسلاید ۱۳ و در روش ریوانول ۷ درصد گزارش کردند. فرازی و حسینی در سال ۱۳۹۰ با بررسی ۳۰۰ گوسفند در یک گله‌ی دارای سابقه‌ی سقط نشان دادند روش‌های الیزا، فیکساسیون کمپلمان و رایت نسبت به رزبنگال و 2ME از حساسیت بیش‌تری برخوردار هستند. همچنین همسو با بررسی حاضر نشان دادند که تست الیزا حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش سرولوژیک است.

Sadhu و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مقایسه‌ای روش‌های رزبنگال، سروآگلوتیناسیون و الیزا در گوسفند و بز نشان دادند آزمایش الیزا حساسیت کم‌تری نسبت به رزبنگال و سروآگلوتیناسیون دارد و روش مناسبی برای غربالگری بز و گوسفند است که با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی ندارد. آن‌ها همچنین آلودگی با جرم‌هایی مانند *ویبریو کلرا*، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، گونه‌های پاستورلا و سالمونلا و برخی از اعضای خانواده‌ی بروسلاها را از دلایل ایجاد مثبت کاذب در رزبنگال نسبت به رایت و الیزا برشمرده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

Shafee و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی بروسلوز در گاوها و گاومیش‌های کشتار شده در کشتارگاه کویته در پاکستان به این نتیجه رسیدند که شیوع در آزمون‌های الیزا و رزبنگال به ترتیب ۳/۲ و ۳ درصد است. Kerkhofs و همکاران در سال ۱۹۹۰ با مقایسه‌ی روش‌های MRT و الیزا روی نمونه‌ی شیر به این نتیجه رسیدند که الیزا حساسیت بالاتری از آزمون MRT در تشخیص بروسلوز دارد.

Manishimwe و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مقایسه‌ی روش‌های رزبنگال و الیزا روی نمونه‌های سرمی گاو به این نتیجه رسیدند که تمامی نمونه‌های الیزا مثبت، رزبنگال آن‌ها نیز مثبت می‌شود، اما برعکس آن صادق نیست و آزمون رزبنگال ممکن است دارای نتایج مثبت کاذب است. آن‌ها عدم تمایز بین آنتی‌بادی ناشی از آلودگی طبیعی با آنتی‌بادی ناشی از واکسن S19 و همچنین واکنش‌های متقاطع بین *بروسلا آبورتوس* و دیگر باکتری‌های گرم منفی را از علل ایجاد نتیجه‌ی مثبت کاذب دانسته‌اند. مثبت بودن تعدادی از نمونه‌های تحقیق حاضر در آزمایش الیزا و نتیجه‌ی منفی آن‌ها در آزمون رزبنگال نیز با دلایل محققین مطالعه‌ی فوق قابل توجیه است هرچند که گاومیش‌های تحت مطالعه‌ی حاضر سابقه‌ی واکسیناسیون را در تاریخچه‌ی خود نداشتند.

همسو با بررسی حاضر انصاری‌نیا و همکاران در سال ۱۳۹۲ با بررسی ۱۱۸۳ فرد مشکوک به بروسلوز نشان دادند آزمایش رایت حساسیت کم‌تر و موارد منفی کاذب بیش‌تری نسبت به آزمایش الیزا دارد و توصیه نمودند از روش الیزا به جای رایت به علت حساسیت بالا، عدم وجود پدیده‌ی پروزون یا آنتی‌بادی بلوکان در تشخیص استفاده گردد.

باغچه‌سرایی و اسماعیلی در سال ۱۳۸۲ با بررسی سرمی ۱۷۶ فرد مشکوک به بروسلوز نشان دادند حساسیت آزمون رزبنگال در مرحله‌ی حاد بیماری مشابه آزمایش الیزا است، ولی در مرحله‌ی مزمن بیماری حساسیت آن پایین است و آزمون الیزا به دلیل سنجش کمی تیتر آنتی‌بادی، تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی و تشخیص مرحله‌ی حاد و مزمن بیماری، حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به آزمون رزبنگال در مرحله‌ی مزمن بیماری دارد. اصالت‌منش و همکاران در سال ۱۳۸۷ با بررسی ۳۱ بیمار مشکوک به بروسلوز به این نتیجه رسیدند آزمون الیزا در تشخیص بروسلوز حساسیت بسیار بالایی دارد و ویژگی آن هم پایین نیست و از الیزا می‌توان به عنوان آزمون تشخیصی حساس استفاده نمود. وکیلی و همکاران در سال ۱۳۸۹ با مطالعه روی ۴۵۶ نمونه سرم انسانی مشکوک به تب مالت اظهار نمودند با توجه به حساسیت بالای الیزای IgG و ویژگی بالای الیزای IgM بهتر است در موارد مشکوک از الیزا در کنار سایر آزمون‌های آگلوتیناسیون برای تشخیص بروسلوز استفاده شود همچنین در مطالعه‌ی Fayyaz Jahani و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که آزمون الیزا حساسیت بالایی دارد. Najafi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در یک مطالعه روی بروسلوز انسانی به این نتیجه رسیدند که آزمایش رایت در مقایسه با آزمایش الیزا حساسیت بالاتری دارد که این یافته با نتایج ما هم‌خوانی ندارد، همچنین در یک مطالعه در ترکیه که روی سرم ۱۸۴ بیمار انجام گرفت آزمون رایت را از رزبنگال و الیزا معتبرتر دانستند (Sirmatel et al. 2002).

این بررسی نشان داد تشخیص بروسلوز از طریق کیت‌های الیزای تجاری که در کشورهای صنعتی ساخته شده‌اند به علت متفاوت بودن نحوه‌ی کنترل بیماری در آن کشورها و پایین بودن نقطه‌ی برش در این کیت‌ها قابل استفاده در کشور ما نمی‌باشند و در صورت نیاز به استفاده بایستی نقطه‌ی برش مجدداً محاسبه گردد البته مسلماً آزمایش الیزا به علت زمان کم مورد نیاز برای انجام، قابلیت طراحی برای انواع آنتی‌ژن‌ها، توانایی سنجش تعداد زیاد نمونه به طور همزمان، خطای کم‌تر و مقرون به صرفه بودن می‌تواند جایگزین بقیه‌ی آزمون‌های سرولوژیک در تشخیص بروسلوز در گاومیش گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر تأمین هزینه‌ی اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

اصالت‌منش، کمال؛ سلیمانی، زهرا؛ ارج، عباس؛ اکبری، حسین و ثالثی، منصور (۱۳۸۷). بررسی توان آزمون ELISA(IgG, IgM) در تشخیص بروسلوز. فصلنامه علمی- پژوهشی فیض، ۱۲ (۳): ۵۰-۴۷.

انصاری‌نیا، حسین؛ زارع، فاطمه و ندوشن، حسین‌هادی (۱۳۹۲). مقایسه آزمایش آگلوتیناسیون رایت و الیزا در افراد مشکوک به بروسلوز. مجله علوم آزمایشگاهی، ویژه‌نامه باکتری‌شناسی، ۷ (۷): ۵۰-۴۵.

باغچه‌سرایی، حمید و اسماعیل‌زاده، عبدالرسول (۱۳۸۲). بررسی قدرت تشخیصی آزمون رزبنگال در مقایسه با الیزا در بروسلوز حاد و مزمن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی زنجان، صفحات ۲۹-۴۲،۲۵.

ذوقی، اسماعیل؛ وندیوسفی، جلیل و حاجی‌خانی، رامین (۱۳۸۳). تکنیک‌های آزمایشگاهی بروسلوز در دامپزشکی و پزشکی، تألیف: آلتون، جونز، آنگوس و ورجر. چاپ اول، ناشر: قلمستان هنر دانشگاه آزاداسلامی، صفحات: ۵۶-۴۲ و ۲۲۰-۱۰۰.

فرازی، علی‌اصغر و حسینی، سیدداود (۱۳۹۰). اعتبار تشخیصی تست‌های سرولوژی رایج در بروسلوز، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، ۶ (۳): ۷۷-۷۱.

مرشدی، احمد، احمدی، ملاحت، صالحی‌زهرایی، تقی و سقایی، پریسا (۱۳۸۹). ارزیابی آزمون PCR در تشخیص بروسلوز گاوها و مقایسه آن با روش‌های سرولوژی استاندارد، مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۵ (۳): ۲۱۵-۲۱۱.

نادرفرد، حمیدرضا (۱۳۸۹). پرورش گاومیش و تحقیقات. تألیف: آنتونیو بورگیز. چاپ اول، تهران، وزارت جهاد و کشاورزی، معاونت امور تولیدات دامی، صفحات ۴۳۶-۵۴۰.

وکیلی، زریچهر، مؤمن‌هروی، منصوره، شریف، علیرضا و معصومی، مریم (۱۳۸۹). حساسیت و ویژگی آزمون الیزا در تشخیص بیماری بروسلوز. مجله پزشکی کوثر، ۱۵(۲): ۹۸-۹۵.

Ahouran, M.; Saadat, S.; hashemitabar, GH. and Mardaneh, J. (2013). Diagnosis of brucellosis: sensitivity and specificity of ELISA test. 5th National Iranian Congress of Brucellosis, 29-31 (Abst).

Bryan, M.; Finola, L.; Marie, A.C. and Doris, M. (2013). Clinical veterinary microbiology. Second edition. London, Mosby Elsevier: 325-334.

Fyyaz Jahani, F.; Ahmadnezhad, E. and Souldozi, M. (2013). ELISA test for detection active brucellosis in cases of occupational disease from hyper-endemic area. 5th National Iranian congress of Brucellosis. 5, (Abst).

Jagapur, R.V.; Rathore, R.; Karthik, K. and Somavanshi, R. (2013). Seroprevalence studies of bovine brucellosis using indirect-enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) at organized and unorganized farms in three different states of India. Veterinary World, 6(8): 550-553.

Kerkhofs, P.; Botton, Y.; Thiange, P.; Dekeyser, P. and Limet, J.N. (1990). Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. Veterinary Microbiology, 24: 73-80.

Mahajan, S.; Agrawal, R. and Pande, N. (2011). A comparative evaluation of different diagnostic tests for brucllosis in buffaloes. Buffalo Bulletin, 30 (1):75-78.

www.SID.ir

Archive of SID

Manishimwe, R.; Ntaganda, J.; Habimana, R.; Nishimwe, K.; Byukusenge, M.; Dutuze, F. et al. (2015). Comparison between Rose Bengal plat test and competitive enzyme linked immunosorbent assay to detect bovine brucellosis in Kigali city, Rwanda. Journal of Veterinary Science and Technology, 6(1): 1-4.

Munir, R.; Farooq, U.; Fatima, Z.; Afzal, M.; Anwar, Z. and Jahangi, M. (2011). Seroprevalence of brucellosis in bovines at farms under different management conditions. British Journal of Dairy Sciences, 2(3): 35-39.

Najafi, N.; Davoodi, L.; Fazli, M.; Davoudi A. and Yazdani Charati, J.W. (2014). Diagnostic value of ELISAversus wright in human brucellosis with positive PCR. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 24: 21-28.

Nowroozi-Asl, A.; Oliaei, A. and Poormahmood-Shalgahian, M. (2007). A serological survey of brucella spp. in water buffalo in Khoozestan province, Iran. Italian Journal of Animal Science, 6 (2): 825-827.

Patel, P.A.; Modi, L.C.; Patel, S.P.; Jadhav, K.M. and Falguni, M. (2011). Seroprevalence of brucellosis in buffalo bulls used for natural service in Mehsana milk shed area, Gujarat. Journal of Indian Veterinary Association, Kerala, 9 (2): 64-65.

Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (2007). Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Saunders Elsevier, Edinburgh, Pp: 963-984.

Rahman, M.S.; Her, M.; Kim, J.Y.; Kang, S.I.; Lee, K.; Uddin, M.J. et al. (2012). Brucellosis among ruminants in some districts of Bangladesh using four conventional serological assays. African Journal of Microbiology Research, 6, 4775-4781.

Ramadan, K.M.; Hazem, S.S. and Khairy, E.A. (2013). Seroprevalence of brucella infection among buffaloes in Gharbyia Governorate. Global Veterinaria, 11 (2): 206-213.

Sadhu, D.B.; Panchasara, H.H.; Chauhan, H.C.; Sutariya, D.R.; Parmar, V.L. and Prajapati, H.B. (2015). Seroprevalence and comparison of different serological tests for brucellosis detection in small ruminants. Veterinary World, 8(5):561-566.

Sanjrani, S.N.; Mirbahar, K.B.; Soomro, H. and Sahito, H.A. (2013). Prevalence of abortion in kundhi buffalo in district Hyderabad, sindh – Pakistan. Herald Journal of Agriculture and Food Science Research, 2 (1): 70-77.

Shafee, M.; Rabbani, M.; Ahmad, M.; Muhammad, K.; Sheikh, A.A.; Awan, M.A. and Shabbir, M.Z. (2012). Seroprevalence of bovine brucellosis using indirect ELISA in Quetta Balochistan, Pakistan. The Journal of Animal and Plant Sciences, 22(3): 125-127.

Sirmatel, F.; Turker, M. and Bozkurt, A.I. (2002). Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis of brucellosis. Mikrobiyoloji Bulteni, 36(2): 161-167.

Suazo-Cortez, R.; Romero-Salas, D.; Villagómez-Cortés, J.A.; Itzcoatl, D. and Martínez–Herrera, D.I. (2012). First notification on the presence of brucellosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Mexico by serological tests. African Journal of Microbiology Research, 6(13): 3242-3247.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 13, No. 1, Spring, 2017

Comparison of serological methods for the diagnosis of brucellosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*)

Azarkamand, B.[1]; Pourmahdi Borujeni, M.[2]; Gharibi, D.[3] and Ghorbanpour, M.[4]

Received: 06.10.2015 Accepted: 23.04.2016

Abstract

Brucellosis is zoonotic and contagious disease caused by the genus *Brucella.* In buffalo, the disease mainly occurred by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* and causes significant economic losses including abortion, loss in milk production and low fertility rates in animals. In this study, serum samples from 320 slaughtered water buffaloes were collected from Ahvaz abattoir during 2014-2015. The collected sera were analyzed for the presence of antibody against *brucella* by two commercial ELISA kits (IDEXX and ID vet), Wright and Rose Bengal methods and the results were analyzed by Cochran and Mc Nemar test. The results showed that the seroprevalence of brucellosis with Wright method was 1.56%. Significant difference was seen between IDEXX ($P<0.001$) and ID vet ($P<0.01$) ELISA kits with Wright and Rose Bengal methods, but there was no significant difference between two ELISA kits ($P>0.05$). Agreement between Rose Bengal and Wright methods with IDEXX and ID vet ELISA kits was moderate and Kappa statistic for these associations were 0.43 and 0.48 respectively, but agreement between Rose Bengal method with Wright method was very good and Kappa statistic for these association was 1. Agreement between IDEXX and ID vet ELISA kits was very good and Kappa statistic for this association was 0.86. This research showed that the sensitivity of ELISA is more than Rose Bengal and Wright methods, but according to the strategy of disease control in Iran, it is recommended that this method is designed for practical use by determining the cut-off point of the test.

Key words: Brucellosis, Diagnosis, Serology, Buffalo

1- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Pourmahdi Borujeni, M., E-mail: Pourmahdim@Scu.ac.ir

www.SID.ir