مقایسه ارزش سه روش کشت مدفوع، آزمایش آگلوتیناسیون و الایزای نقطه ای در تشخیص حاملین سالمونلا دابلین در گوساله های به ظاهر سالم

دکتر تقی زهرایی صالحی[1]* دکتر محمد قلی نادعلیان[2] دکتر یلدا فقیه حبیبی[3]

دریافت مقاله: ۲۲آبان ماه ۱۳۸۰
پذیرش نهایی: ۳۰ تیر ماه ۱۳۸۲

هدف: تشخیص حاملین سالمونلا با سه روش کشت مدفوع، آزمایش آگلوتیناسیون و آزمایش الایزای نقطه ای و مقایسه آنها با یکدیگر.

طرح: مطالعه آزمایشگاهی و میدانی.

روش: تعداد دویست و شانزده نمونه مدفوع و سرم از گوساله های به ظاهر سالم از گاوداریهای اطراف تهران اخذ گردید. نمونه های مدفوع در محیط های غنی کننده و انتخابی کشت داده شدند. بر روی نمونه های سرم، آزمایش ویدال یا آگلوتیناسیون لوله ای O و H انجام شد. برای انجام این آزمایشها تعلیقهای پادگنی مناسب O و H از *سالمونلا دابلین* تهیه گردید. همچنین برای انجام آزمایش الایزای نقطه ای آنتی ژن H خالص از سالمونلا دابلین تهیه شد.

تجزیه وتحلیل آماری: آنالیز واریانس و در صورت وجود اختلاف معنا دار، استفاده از آزمون دانکن.

نتایج: از ۲۱۶ نمونه مدفوع در ۶ مورد سالمونلا جدا گردید که شامل چهار مورد *سالمونلا تیفی موریوم* و دو مورد *سالمونلا دابلین* بود. در آزمایش آگلوتیناسیون تعداد ۵ نمونه با عیار O ، بالاتر از مثبت بودند. در آزمایش الایزا نیز ۱۵ نمونه مثبت وجود داشت.

نتیجه گیری: در مقایسه روشهای انجام شده نتایج آزمایشات بیانگر حساسیت بیشتر روش الایزای نقطه ای به علت مشخص نمودن تعداد بیشتر دامهای حامل می باشد. تعداد موارد مثبت روش آگلوتیناسیون از بقیه کمتر بود. در بررسیهای آماری در مقایسه روشهای فوق، تستهای الایزا و کشت مدفوع و ویدال، ۲ به ۲ مورد مقایسه قرار گرفتند. تستهای ویدال و کشت مدفوع از همخوانی و توافق بالایی برخوردار بودند که ضریب کاپای به دست آمده تا حدودی مؤید همین مطلب بود. همچنین بین تستهای الایزا و ویدال هم، همخوانی برقرار بود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۳، ۲۹۱-۲۸۷.

واژه های کلیدی: سالمونلوز، آزمایش ویدال، الایزا، گاو، حامل، *سالمونلا دابلین*.

بیماری سالمونلوز از بیماریهای مهم مشترک بین انسان و دام می باشد که همه ساله خسارات هنگفتی به صنعت دامداری کشور وارد می سازد. این بیماری همچنین برای بهداشت و سلامتی جامعه نیز خطرساز است. سالمونلوز مشکل عمده اکثر دامداریها می باشد. دو سروتیپ شایع باکتری در گاو شامل *سالمونلا دابلین* و *سالمونلا تیفی موریوم* می باشد. نشانیهای بالینی بیماری در گاوان شیری به صورت سقط، اسهال، سپتی سمی و در گوساله ها به صورت اسهال خونی همراه با کستهای نکروتیک، سپتی سمی و پنومونی است(۲،۷،۱۷،۳۰).

عامل عمده انتشار بیماری در سطح گله حاملین سالمونلا می باشند که بعد از بهبود باکتری را از مدفوع خود دفع می کنند. بنابراین شناسایی و تشخیص این حاملین به منظور کنترل و پیشگیری از وقوع موارد جدید بسیار ارزشمند است. روشهای مختلف باکتریولوژی مثل کشت مدفوع، و روشهای سرولوژی مثل ویدال یا آگلوتیناسیون و الایزا در تشخیص حاملین مورد توجه قرار گرفته و با یکدیگر مقایسه شده است (۲۱،۲۳).

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول tzahraei@yahoo.com

Comparison of three methods: culture of feces, agglutination test and Dot ELISA for diagnosis of inapparent infection of *salmonella dublin* in calves

Zahraei Salehi, T.,[1] Nadalian, M.Gh.,[2] Faghih Habibi, Y.[3]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.* [2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran -Iran.* [3]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran -Iran.*

Objective: Diagnosis of *Salmonella* carrier calves by using feces culture, agglutination test and Dot ELISA.

Procedure: 216 sera and feces samples were obtained from calves in farms of around of Tehran . The feces sampels were cultured in enrichment and selective media and then isolated *Salmonella* were serotyped by O and H antisera. The sera samples were tested for O and H agglutinins via Widal and Dot ELISA tests.

Statistical analysis: ANOVA and when a significance different was seen, Duncan's Multiple Range Test.

Results: In this study two serotypes including: *Salmonella typhimurium* (4 cases) and *Salmonella dublin* (2 cases) were isolated from feces. In serological tests 5 and 15 sera samples were positive in Widal and ELISA tests respectively.

Conclusion: From the results of this study it seems that dot Elisa method is very sensitive in diagnosis of *Salmonella* carrier calves than other tests.

Key words: Salmonellosis, Widal test, Dot ELISA, Cattle, Carrier, *Salmonella dublin*. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 3: 287-291, 2003.***

Corresponding author email:tzahraei@yahoo.com

Velling وهمکاران در سال ۲۰۰۰ تست الایزا را با آزمایش ویدال و کشت مدفوع برای تشخیص عفونت سالمونلا دابلین به کار برده اند و مقایسه ای بین تستهای فوق انجام داده اند (۲۹). نامبرده از روش الایزای غیر مستقیم با آنتی ژن تاژکی استفاده کرده و آزمایش ویدال O و H جداگانه برای مقایسه صورت گرفته است. در این مقایسه حساسیت الایزا ۹۳ درصد تعیین شد ه است. در واقع ۴۰ درصد از ۵۰ نمونه مثبت از نظر کشت، با الایزا مثبت شدند. در بررسی نتایج الایزا و روش ویدال و کشت مدفوع، توافق بین تستهای فوق وجود داشته و مشخص شده که آگلوتیناسیون H می تواند در نمونه گیریهای انفرادی در تشخیص حاملین مؤثر باشد. الایزا نیز تست تشخیصی خوب در برنامه های کنترلی سالمونلا شناخته شده است (۲۹).

Smith در سال ۱۹۸۹ عفونت پستانی *سالمونلا دابلین* را در گاوان حامل با استفاده از روش الایزا مشخص نمود. این آزمایش روی نمونه سرم و شیر صورت گرفت. در کنار آن کشت از غده لنفاوی و کشت مدفوع (۲ بار در ماه به مدت ۶ ماه) نیز انجام شد. نتایج نشان از توافق تیترهای الایزای سرم و شیر بود. همچنین در ۱۴ درصد دامهایی که نتایج الایزای آنها مثبت بود، کشت مدفوع نیز مثبت اعلام شد که این نشان از دفع متناوب باکتری از

طریق مدفوع است و دام با این وجود می تواند حامل باقی بماند (۲۵).

Kouse در سال ۱۹۹۳ آزمایش الایزا را برای تشخیص سرولوژی حاملین همراه با روش کشت مدفوع به کار برد. همه گاوان که از نظر سرمی مثبت بودند، کشت مدفوع از آنها به عمل آمد. هیچ کدام از گاوان که ازنظر کشت مثبت بودند، آزمایش الایزای آنها منفی نبود. در پایان نکروپسی این گاوان انجام شد و در کشت عقده لنفاوی، همه ۱۳ گاو مورد مطالعه از نظر کشت مثبت گردیدند (۱۴).

در این تحقیق، نیز به دنبال کارهای دیگر محققین، به منظور تشخیص حاملین در سطح گله، سه روش الایزای نقطه ای، ویدال و کشت مدفوع با یکدیگر مقایسه شده اند تا بتوان راه بهتر و دقیقتر و با هزینه کمتری را برای تشخیص حاملین، انتخاب نمود و روش مناسبتری را در بین این روشها پیشنهاد کرد. با شناسایی این حاملین و حذف آنها از گله می توان از وقوع موارد جدید جلوگیری نمود و تا حدی بیماری را کنترل کرد.

مواد و روش کار

نمونه گیری: نمونه های مدفوع با تحریک رکتوم از دفع تازه دام گرفته شد و در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه های خون نیز به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد تا لخته ایجاد گردد و سرم آنها جدا شود. سرمها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده می شدند (۳۰).

کشت: نمونه های مدفوع بعد از غنی سازی در محیط سلنیت F بر روی محیطهای انتخابی از جمله مک کانکی کشت داده شده و پرگنه های مشکوک به سالمونلا بر روی محیط اوره و TSI برده می شد (۲،۱۱).

سروتایپینگ: این کار توسط آنتی سرمهای اختصاصی شرکت دیفکو صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا از آنتی سرم پلی والان و سپس از آنتی سرم اختصاصی گروه و در نهایت آنتی سرم اختصاصی ضد H برای تعیین سروتیپ سالمونلا های جدا شده استفاده گردید (۱،۵).

آزمایش ویدال: برای انجام این آزمایش تعلیق پادگنی O و H به صورت زیر آماده گردید:

تعلیق پادگنی O: برای تهیه این تعلیق از *سالمونلا دابلین* جدا شده، پس از اطمینان از خلوص آن، بر روی محیط برین هارت برده شد و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، با سرم فیزیولوژی از آن شیرابه یکنواختی تهیه گردید. سپس هم حجم آن الکل اتیلیک ۹۶ درجه به شیرابه اضافه شد. با افزودن سرم فیزیولوژی استریل غلظت نهایی محلول به ۵۰۰ تا ۹۰۰ میلیون جرم در میلی لیتر رسانده شد. این تعلیق به مدت طولانی در یخچال قابل نگهداری است (۲،۶،۱۰).

تعلیق پادگنی H: برای تحریک حرکت باکتری از کشت ۲۴ ساعته باکتری داخل لوله های U از یکطرف کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری باکتری های متحرک خود را به سطح دیگر لوله می رسانند. از این طرف لوله برداشت کرده و در ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر آبگوشت برین هارت کشت داده شد. بعد از یک شب گرمخانه گذاری، محیط را سانتریفوژ کرده و رسوب ته لوله در سرم فیزیولوژی استریل حل گردید. به این تعلیق ۰/۶ درصد فرمالین تجاری جهت تثبیت تاژکهای باکتری افزوده شد و با اضافه کردن سرم فیزیولوژی غلظت نهایی آن ۹۰۰-۵۰۰ میلیون جرم در میلی لیتر رسید (۲،۹،۱۱). برای انجام آزمایش رقتهایی از سرم تهیه گردید و تعلیق پادگنی به آن افزوده شد.

الایزای نقطه ای: برای انجام آزمایش فوق، ابتدا آنتی ژن H خالص تهیه گردید. برای این کار و برای تحریک حرکت، باکتری روی محیط SIM برده شد. سپس از این محیط روی محیط آبگوشت برین هارت کشت داده و بعد از یک شب گرمخانه گذاری، با سانتریفوژ، مایع رو جدا و رسوب ته لوله در سرم فیزیولوژی حل گردید. سپس عمل ورتکس با گلوله شیشه ای به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و بعد از سانتریفوژ کردن با دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه مایع رو به عنوان تعلیق آنتی ژنی H مورد استفاده قرار گرفت و با روش Wurburg پروتئین آن تعیین شد (۱). کاغذهای نیتروسلولز به ابعاد ۱۱ سانتیمتر مورد استفاده قرار گرفت و از آنتی ژن تهیه شده به میزان ۲ میکرولیتر بر روی کاغذ نیتروسلولز لکه گذاری شد. بعد از خشک شدن لکه ها (به مدت ۳۰ دقیقه) در دمای آزمایشگاه بافر بلوک کننده (برای جلوگیری از واکنشهای غیراختصاصی) به مدت یکساعت روی آنها اضافه گردید. بافر بلوک کننده شامل شیر بدون چربی ۱۰ درصد بود. سپس کاغذها ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر حاوی توئین شستشو داده شدند و آنگاه کاغذها در رقت ۱/۱۰ سرم غوطه ور گردیدند و به مدت یکساعت در گرمخانه قرار داده شدند. نمونه ۴۰۷ به عنوان شاهد مثبت و سرم خرگوش به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار می گرفتند. بعد از این مرحله دوباره ۳ مرتبه شستشو با بافر حاوی توئین و هر بار به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. سپس کاغذها ۳۰ دقیقه در محلول آنتی گلوبولین کنژوگه با پراکسیداز قرار گرفتند. بعد از این مرحله هم ۳ بار شستشو و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با بافر حاوی توئین صورت گرفت و در نهایت سوبسترا بر روی کاغذها اضافه شد تا لکه قهوه ای رنگی در محل آنتی ژن در موارد مثبت ظاهر شود. سوبسترای مورد استفاده دی آمینو بنزیدین بود (۱).

نتایج

کشت مدفوع: از ۲۱۶ نمونه کشت داده شده، تعداد ۶ مورد (شماره های ۱۱۹۵۰، ۹۲۴، ۹۲۵، ۹۸۶، ۲۰۳۷، ۲۸) مثبت بودند.

سروتایپینگ: گروه و سروتیپ سالمونلاهای جداشده در جدول ۱ آورده شده است.

آزمایش ویدال: از ۲۱۶ نمونه سرم آزمایش شده ۵ نمونه دارای تیتر پادتنی O و H بودند. نمونه ۴۲۳ و ۱۱۹۵۰ در ویدال O عیار ۱/۱۶۰ داشتند ولی در ویدال H هیچ عیاری نشان ندادند. بنابراین اگر ملاک مثبت بودن را عیار ۱/۴۰ O و ۱/۱۶۰ H قرار دهیم تعداد سه نمونه مثبت بودند.

آزمایش الایزای نقطه ای: ازمجموع ۲۱۶ نمونه سرم آزمایش شده تعداد ۱۵ نمونه مثبت شدند و لکه قهوه ای در اثر سوبسترا بر روی آنتی گلوبولین کنژوگه باند شده با ایمونوگلوبولین موجود در سرم که به آنتی ژن اتصال یافته بود، ایجاد شد. درنتایج آماری انجام شده، در مقایسه ۲ به ۲ روشها با یکدیگر، در مقایسه الایزا و ویدال توافق در حد متوسط بود و ضریب کاپای به دست آمده ۰/۴۰۳۶ بود ($P<0/0001$)، آزمون Z نیز ۷/۳۹ بود که این نشان از همخوانی خوب و معنی دار بین ۲ تست فوق است (۹۵/۳ درصد).

در مقایسه روش الایزا و کشت، ضریب کاپا ۰/۱۱۷۳ به دست آمد و توافق در حد ضعیف بود ($P=0/000122$). آزمون Z نیز ۳/۹۷ به دست آمد ولی ازنظر آماری همخوانی این دو با یکدیگر معنی دار نبود (۹۳/۳ درصد). در مقایسه روش کشت و ویدال، ضریب کاپا ۰/۳۹۵۵ به دست آمد درنتیجه توافق در حد متوسط بود ($P<0/0001$) آزمون Z نیز ۷/۳۰ به دست آمد و ازنظر آماری نیز همخوانی این دو معنی دار بود (۹۸/۶ درصد).

جدول۱- نتایج سروتایپینگ سالمونلاهای جداشده در این تحقیق، سال ۱۳۸۰ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

شماره نمونه	گروه	آنتی ژن g.p	آنتی ژن تاژکی i	آنتی ژن تاژکی ۲ و ۱	سروتیپ
۱۱۹۵۰	D	+	-	-	*S.dublin*
۹۲۴	B	-	+	+	*S.typhimurium*
۹۲۵	B	-	+	+	*S.typhimurium*
۹۸۶	B	-	+	+	*S.typhimurium*
۲۸	B	-	+	+	*S.typhimurium*
۲۰۳۷	D	+	-	-	*S.dublin*

جدول ۲- عیارسرمهای مثبت گوساله های مورد مطالعه در آزمایش آگلوتیناسیون O و H، سال ۱۳۸۰ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

شماره نمونه	عیار پادتن O	عیار پادتن H
۴۲۳	۱/۱۶۰	—
۱۱۹۵۰	۱/۱۶۰	—
۴۱۸	۱/۱۶۰	۱/۱۶۰
۴۰۷	۱/۱۶۰	۱/۳۲۰
۴۱۳	۱/۴۰	۱/۱۶۰

بحث

در گذشته محققین متعددی بر روی روشهای جداسازی سالمونلاها و ارزیابی روشهای تشخیصی مختلف در شناسایی این باکتری ها کار کرده اند. هرکدام از این محققین گاه این روشهای تشخیصی را جداگانه و گاه توأم مورد بررسی قرار داده و حساسیت و ویژگی آنها را محاسبه کرده اند. Richardson معتقد است که حاملین نهفته سالمونلا را می توان با استفاده از روش کشت مدفوع در زمان زایمان مشخص نمود. Wray و همکاران در سال ۱۹۷۷، نمونه های سرمی گاوان را به روش SAT برای حضور آنتی بادی ضد سالمونلا مورد آزمایش قرار داد و نشان داد که تیتر ۱/۳۲۰ برای آنتی ژن تاژکی و ۱/۴۰ برای آنتی ژن سوماتیک نشان از حضور آلودگی است . Smith در سال ۱۹۸۹ عفونت با *سالمونلا دابلین* را در گاوان حامل با استفاده از روش الایزا روی سرم و شیر این گاوان، تشخیص داد. همزمان با روش الایزا، کشت مدفوع هم روی این گاوان انجام شد و نشان داده شد که ارتباط مناسبی بین تیتر الایزا و کشت مدفوع وجود دارد. Velling در سال ۲۰۰۰، سه روش الایزا، SAT و کشت مدفوع را همگام با هم برا ی تعیین حاملین فعال *سالمونلا دابلین* در گله های گاو شیری به کار برد. الایزا و SAT قادر بودند که به ترتیب حدود ۳۰ و ۴۶ درصد از ۵۰ حیوانی را که از نظر کشت مدفوع مثبت بودند مشخص کنند. در این تحقیق ویژگی الایزا ۹۴ درصد و SAT ۹۶ درصد تعیین شد. ضریب کاپا در این تحقیق نشان از توافق بین الایزا و SAT و کشت مدفوع بود. Galland در سال ۲۰۰۰ شیوع سالمونلا را در گاوان گوشتی با کشت مدفوع و الایزا مورد بررسی قرار داد و نشان داد که این دو روش برای بررسی شیوع سالمونلا در گله مؤثر می باشند.

در تحقیق حاضر نیز سه روش کشت مدفوع، SAT (ویدال O و ویدال H) و الایزای نقطه ای همزمان با هم در تشخیص آلودگی *سالمونلا دابلین* در گوساله های به ظاهر سالم یا به عبارتی تشخیص حاملین *سالمونلا دابلین* به کار گرفته شد چرا که گاه ممکن است یک دام در آزمایش کشت مدفوع از نظر وجود جرم منفی باشد، ولی از نظر سرمی دارای عیار پارتنی باشد، در نتیجه مقایسه این روشها مورد توجه قرار گرفت. در این تحقیق روش الایزای نقطه ای که در واقع روش تغییر شکل یافته الایزا و آسانتر از آن می باشد، همراه با آگلوتیناسیون لوله ای ویدال O و H روی سرمها انجام شد تا هم ارزیابی الایزای نقطه ای در تشخیص حاملین سالمونلا صورت گیرد و هم اینکه این آزمایش از نظر نتایج با ویدال O و ویدال H مقایسه گردد. همان طور که از نتایج روشهای الایزا و آزمایش ویدال O و H مشخص می گردد، تعداد موارد مثبت روش الایزای نقطه ای نسبت به آزمایش ویدال O و H بیشتر است . البته همه موارد مثبت آزمایش ویدال O و H نیز در این آزمایش مثبت شدند. آنتی ژن تاژکی مورد استفاده ممکن است در سروتیپ های گروههای دیگر جدول کافمن وایت نیز وجود داشته باشد و باعث بروز موارد مثبت کاذب در این آزمایش گردد ولی با توجه به اینکه سروتیپ غالب در گاو در اکثر کشورها و همچنین ایران *سالمونلا دابلین* است بنابر این احتمال فوق تأثیر زیادی نمی تواند در آزمایش داشته باشد. همچنین برای کاهش موارد مثبت کاذب از آنتی ژن تاژکی *سالمونلا دابلین* که فقط دارای فاز g.p می باشد استفاده گردید تا آنتی ژن تاژکی مورد استفاده سبب ویژگی زیاد درجهت تشخیص عفونت ناشی از *سالمونلا دابلین* در گاو گردد.

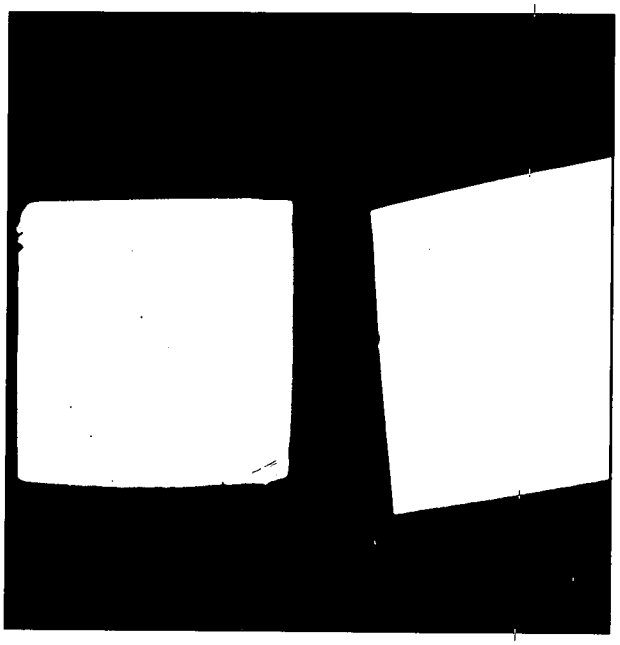
در روش سرولوژی ویدال از ۲۱۶ مورد، ۵ مورد دارای تیتر پادتنی در حد مثبت بودند. البته تنها یک مورد از این موارد از نظر کشت مدفوع مثبت گردید (نمونه شماره ۱۱۹۵۰).

در مورد روش الایزای نقطه ای از ۲۱۶ مورد، ۱۵ مورد مثبت بودند و لکه قهوه ای در مورد آنها روی کاغذ مشخص گردید که ۴ مورد از این موارد مثبت، از نظر ویدال O و H نیز مثبت بودند (۴۰۷، ۴۱۳، ۴۱۸، ۱۱۹۵۰) ولی تنها یک مورد (نمونه شماره ۱۱۹۵۰) از نظر کشت مدفوع هم نتیجه مثبت داشت. این سه گوساله از نظر کشت مدفوع (۴ بار) منفی بودند ولی آزمایش ویدال O و H نشان از وجود عیار پادتنی در آنها بود. در بررسی آماری برای مقایسه نتایج این روشها که هم زمان با هم انجام گرفته است، مشخص گردید که همخوانی و توافق به دست آمده در روش کشت و ویدال از بقیه بیشتر است (همخوانی ۹۸ درصد). ضریب کاپای به دست آمده (۰/۳۹) هم نشان از توافق این دو در حد متوسط بود. این همخوانی از لحاظ آماری نیز معنی دار بود. ولی در بررسیهای به عمل آمده روی کشت مدفوع و الایزای نقطه ای ارتباط و همخوانی این دو از نظر آماری معنی دار نبود. البته تعداد یک مورد کشت مثبت و ۱۵ مورد تعداد الایزای مثبت که تفاوت زیادی باهم دارند نیز مؤید همین مطلب است. با وجود منفی بودن موارد کشت مدفوع در این ۱۵ مورد نمی توان حامل بودن این دامها را رد نمود و حتی در مواردی بعد از چندین بار کشت مدفوع منفی نیز این حالت رد نمی شود.

در مقایسه دو روش ویدال و الایزای نقطه ای نیز همخوانی ۹۵ درصد و ضریب کاپای ۰/۴۰ نشان از توافق این دو تست در حد متوسط بود و این ارتباط نیز از نظر آماری معنی دار بود. در واقع ۴ مورد مثبت در روش ویدال همگی در روش الایزای نقطه ای مثبت بودند. البته تعداد ۱۱ مورد در روش ویدال منفی بودند که این باز دلیل بر رد حالت حامل بودن دام نمی باشد.

در بررسی کلی از نتایج آماری به دست آمده دو درصد از دامهای آزمایش شده هم در ویدال و هم در الایزا مثبت بودند ۹۳ درصد از دامهای آزمایش شده نیز هم در ویدال و هم در الایزا منفی بودند. ۵ درصد از این دامها از نظر الایزا مثبت ولی ازنظر ویدال منفی بوده و هیچ کدام از دامها از نظر ویدال مثبت و ازنظر الایزا منفی نبودند.

در مقایسه کلی روش کشت و ویدال ۰/۴ درصد از دامها در کشت و ویدال مثبت بودند. یک درصد از دامها از نظر کشت منفی و از نظر ویدال



تصویر۱- نمونه های مثبت و منفی در آزمایش الایزای نقطه ای سال ۱۳۸۰ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

مثبت بودند. هیچ کدام از دامها از نظر کشت مثبت و ویدال منفی نبودند، و ۹۸ درصد از دامها از نظر هر دو آزمایش منفی بودند.

در مقایسه کلی روش الایزا و کشت ۰/۴ درصد از دامها از نظر کشت و الایزای نقطه ای هر دو مثبت بودند. ۹۳ درصد از دامها در هر دو مورد منفی بودند. ۶ درصد از دامها از نظر الایزا مثبت ولی از نظر کشت منفی بودند و هیچ کدام از دامها الایزا منفی ولی کشت مثبت نبودند.

در مقایسه این سه روش همخوانی بین روشها و توافق بین تستهای انجام شده وجود داشت. در هر مرحله، مثلاً باکشت مدفوع تعداد موارد کمتری از دامهای حامل به ظاهر سالم مشخص گردید، سپس با آزمایش ویدال این تعداد بیشتر و با آزمایش الایزای نقطه ای که حساسیت بالاتری دارد، میزان بیشتری از این حاملین مشخص گردید. البته در هر مرحله برای تأیید از نتایج آزمایش قبلی استفاده می شد و نتایج با هم مقایسه می گردید. محققین دیگر مثل Smith و Velling ارتباط مناسبی بین الایزا، کشت مدفوع و SAT پیدا نموده اند و ما نیز در این تحقیق بامحاسبه ضریب کاپا تقریباً به نتایج مشابهی رسیدیم. نتایج آزمایشات کشت مدفوع در این تحقیق نیز مؤید نظرات سایر محققان بود (۶،۱۷،۲۱،۲۴،۳۰). در موردگاو های ۴۰۷، ۴۱۸، ۴۱۳ حتی بعد از ۵ بار کشت مدفوع، نتیجه مثبت حاصل نشد.

در پایان می توان نتیجه گرفت که استفاده از کشت مدفوع، روش سرولوژی SAT یا ویدال O و H و الایزا به طور همزمان و مقایسه این روشها با هم و بررسی نتایج آنها بسیار در تشخیص حاملین سالمونلا که معضل مهم و اصلی در اشاعه و گسترش سالمونلا در محیط دامداری هستند، مؤثر است که در این بین الایزا با توجه به حساسیت بالا می تواند روش مناسبتری باشد. البته تهیه آنتی ژن مناسب و خالص تر برای آزمایش الایزای نقطه ای و تثبیت این آنتی ژن بر روی کاغذ و یا روی لام به طوری که بتوان از آن در آزمایشگاهها و حتی گاوداریها برای انجام آزمایشات سریع استفاده نمود ضروری است.

تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق از طریق طرح مصوب دانشگاه تهران به شماره ۲۱۵/۱/۵۱۷ پرداخت شده است که بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی تشکر و قدردانی می گردد و همچنین مؤلفان از حمایت مالی طرح قطب علمی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بابت قبول هزینه چاپ این مقاله تشکر می نمایند.

References

۱. ایزدی قهقرخی، ف. (۱۳۷۹): ارزیابی کیت الایزای نقطه ای، پایان نامه دوره دکترای عمومی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد شهر کرد، صفحه: ۳۰-۳۱.

۲. تاج بخش، ح. (۱۳۷۴): ایمنی شناسی بنیادی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ ششم، صفحه: ۶۳۸-۶۳۶.

۳. زهرایی صالحی، تقی. (۱۳۷۸): سالمونلا ، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۱۹۱و۱۰۳-۱۰۱ و ۲۷-۲۳ و ۷ و ۱.

۴. زهرایی صالحی، ت. (۱۳۷۲): آندوتوکسین باکتریهای گرم منفی، شماره ۳۷، انتشارات دوره تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحه: ۱۳-۸.

۵. محزونیه، م.ر. (۱۳۷۵): ساختار آنتی ژنی *سالمونلا آبورتوس اویس* ، پایان نامه تخصصی میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحه: ۳-۱.

6. Andrewes, A. H. and Blowey, R. W. (1992): Bovine Medicine. Blackwell. Sci. Public. PP: 181-193.
7. Baxton, A. and Fraser, G. (1977): Animal Microbiology, Blackwell. Sci. Public. PP: 103-115.
8. Braoks, G.F. and Butel,G.S. (1995): Medical Microbiology. 20th ed. Appleton and Lange. PP: 214-217.
9. Bager, J. (1991): Sensitivity and specifity of different method for the isolation of *Salmonella* from pigs. Acta. Vet. Scand. 32: 473-481.
10. Carltonl, O. (1988): Pathogenesis of Bacterial Infection in Animal. PP: 95-108.
11. Edward, J.F. (1995): Bacteriologic culture and histologic examination of samples collected from recumbent cattle at slaughter. JAVMA. 9: 1174-1176.
12. Gay, M. and Hunsaker, M.E. (1993): Isolation of multiple *Salmonella* serovars from a dairies after clinical salmonellosis outbreak. JAVMA. 203: 1314-1320.
13. Galland, J.C., House, J. K., Hyaft, I. and Hachkins, D.R. (2000): Prevalance of *Salmonella* in beef feeder steers as determined by bacterial culture and ELISA. Vet. Microbiol. 25. 76: 143-151 .
14. House, J.K. and Smith, B.P. (1993): Enzyme linked immunosorbant assay for serologic detection of *Sallmonella dublin* carriers on a large dairy. Am. J. Vet. Res. 54: 1391-1399.
15. Lance,S.E. and Miller, G.Y. (1992): *Salmonella* infection in neonatal dairy calves. JAVMA. 6: 864-868.

16. Murray, J.M. (1986): *Salmonella*: Virulance Factor and enteric Salmonellosis. JAVMA. 189: 145-147.
17. Nadalian, M.Gh. and Bolourchi, M. (1998): Different clinical aspect of Salmonellosis in calves. XXth World Buiatrics Congress. Proceeding, Sydney. 6-10. Jully. PP: 897-898.
18. Old, D. C. and Therefall, E.J. (1996): Bacteriology, Topley and Willson. PP: 969-996.
19. Penny, C.D., Low, J.C. and Nettleton, P.F. (1996): Concurrent bovine viral diorrhia virus and *Salmonella typhimurium* infection in a group of pregnant dairy hiefers. Vet. Rec. 138: 485-489.
20. Quinn, P.J. and Carter, M.E. (1994): Clinical Veterinary Microbiology. Wolf Publishing. PP: 226-232.
21. Radostit, O.M., Blood, D.C. and Gray. C.C. (1994): Veterinary Medicine. 8th ed. Balliere Tindall. PP: 730-747.
22. Richardson, A. and Park, J.A.C. (1975): A skin test to identify latent *Salmonella dublin* infection in calves. Vet. Bul. 45: 60-76.
23. Richardson, A. (1975): Salmonellosis in cattle. Vet. Rec. 96: 329-331.
24. Smith, B.P. (1996): Large Animal Internal Medicine. Mosby. PP:894- 897
25. Smith, B.P., Oliver, D.G, and Singh, P. (1989): Detection of *Salmonella dublin* mammary gland infection in carrier cows, using an ELISA assay for antibody in milk or serum. Am. J. vet. Res. 8: 1352-1360.
26. Smith, B.P. and Daroden, L. (1994): Prevalence of *Salmonella* in cattle and in the invironment on California dairies. JAVMA. 3: 467-471.
27. Tajbakhche, H. and Nadalian, M.Gh. (1974): Infection experimental par *Salmonella abortus* ovis, de brebis vaccinees. et non vaccines. Rev. Med. Vet. 125: 387-395.
28. Taghipour bazargani, T. and Nadalian, M.Gh. (1992): Dry gangrene of exterimities due to *Salmonella* in calves. The First Convension Vet. Clinicians. Oct. 25-26. PP: 185-199.
29. Velling, J. and Zyderveld, F.G. (2000): Evaluation of three newly developed ELISA assay and two agglutination tests for detecting *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *dublin*. Infection in dairy cattle. J. Clin. Microbiol. 12: 4402-4407.
30. Wray, C. and Wray, A. (2000): *Salmonell*a in domestic animal. CABI publishing. PP: 57-66, 75-77, 169-184, 205-278, 355-367, 397-402 &408-421.
31. Wray, C. and Sojka, W. (1977): Review of the progress of diary science: Bovine salmonellosis. J. Dairy Research. 44: 383-425.