

استفاده از آزمون لکه گذاری نقطه‌ای با پیکره بورخولدريا مالئی برای تشخیص بیماری مشمشه در ایران

سعید محمد حسینی^۱، نادر مصوری^{۲*}، لیدا عبدالمحمدي خیاو^۳

۱. کارشناس ارشد بخش فرانس مایکوباکتریوم‌های بیماریزای دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، سازمان

تحقیقات و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

۲. دانشیار بخش فرانس مایکوباکتریوم‌های بیماریزای دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، سازمان

تحقیقات و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

۳. دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی

کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۷

چکیده

مشمشه یکی از مهم ترین بیماری های قابل انتقال از حیوانات تک سمی بوده که عامل آن بورخولدريا مالئی است. با توجه به کانون بیماری در ایران و احتمال آلودگی انسان و خطرات ناشی از انتقال این باکتری، شناسایی سریع آن در حیوانات از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. لذا هدف از این مطالعه طراحی یک روش تشخیص سریع شامل لکه‌نمایی نقطه‌ای برای تعیین حضور آنتی‌بادی بود. برای این منظور ۴۰ نمونه سرم اسب از استان‌های مختلف اخذ و به همراه نمونه آنتی‌ژن پیکره باکتری بورخولدريا مالئی (کنترل مثبت) و سرم اسب‌های سالم (کنترل منفی) مورد آزمون قرار گرفتند. غلظت بهینه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با استفاده از چکر بورد برای سرم های مثبت و منفی مشخص گردید. پس از طراحی آزمون لکه گذاری نقطه‌ای، آنتی ژن روی چاهک کاغذ نیتروسولوز قرار داده شد و تثبیت آنتی‌ژن با محلول بلاکینگ و سپس افزودن سرم اسب مشکوک به همراه کنترل مثبت و منفی انجام شد. در ادامه به آن آنتی‌بادی کونژوگه اضافه و نهایتاً با افزودن سوبسترا به چاهک ها نتیجه‌ی واکنش به صورت ایجاد رنگ قرائت گردید. در این بررسی از ۴۰ نمونه، شش مورد مثبت شناسایی گردید. با در نظر گرفتن مالیناسیون به عنوان آزمون استاندارد و مقایسه آن با لکه گذاری نقطه‌ای به ترتیب حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ و ۹۱/۹٪ شد. نتایج نشان داد روش لکه گذاری نقطه‌ای به دلیل حساسیت بالا، سرعت، سهولت قرائت و قابلیت کاربردی صحرائی آن، در صورت تایید مراجع مسئول تشخیص در عفونت با بورخولدريا مالئی می تواند استفاده شود.

واژه های کلیدی: بورخولدريا مالئی، مشمشه، لکه گذاری نقطه‌ای، تشخیص.

* نویسنده مسئول: نادر مصوری

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش فرانس مایکوباکتریوم‌های بیماریزای دام، البرز، کرج تلفن: ۰۲۶-۰۲۸-۲۴۵۷۰

پست الکترونیک: n.mosavari@rvsri.ac.ir

مقدمه

مشمشه بیماری زئونوز و کشنده در تک سمیان بوده که عامل آن بورخولدریا مالئی می‌باشد. اولین بررسی‌ها در سال ۱۲۹۸ موارد آلودگی در ایران را بسیار بالا و در تمام مناطق ایران بجز کرمان و مکران گزارش نمود. کارپانتیه در سال‌های ۱۳۱۱-۱۳۰۷ نسبت آلودگی را در اسبان عشایر سه تا چهار درصد و در اسبان ارتش ۲۰-۳۵٪ گزارش نمود (۶). با کاهش استفاده از اسب، موارد مشمشه انسانی تا سال ۱۳۷۲ به شدت کاهش یافت. در سال ۱۳۷۳ کانون‌های تک‌تک مشمشه در اسب‌های ناحیه ساوجبلاغ استان البرز و اصفهان گزارش گردید (۳). در سال ۱۳۷۷، شکل مخفی مشمشه در اسب‌های مسابقه کیش شایع شد. در سال‌های ۱۳۸۲، ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ به ترتیب گزارش ابتلا به دو، سه و دو رأس اسب مثبت اعلام شد (۱). در سال ۱۳۸۹ یک قلاده ببر وارد شده از روسیه، بر اثر ابتلا به مشمشه به دلیل مصرف گوشت الاغ فاقد تست مالئین تلف شد (۱۱).

این باکتری به دلیل انتشار از طریق آئروسول و عدم وجود واکسن و درمان موثر، از سال ۱۹۱۵ میلادی در لیست سلاح‌های بیولوژیک و لیست باکتری‌های پاتوژن CDC و OIE قرار گرفت (۷، ۱۹). شیوع مشمشه در دو دهه اخیر از کشورهای پاکستان، عراق، ترکیه، کویت، بحرین، امارات متحده عربی و سوریه گزارش شد. کشورهای همسایه به ویژه عراق و ترکیه به علت قاچاق کالا توسط اسب‌سانان غیر مجاز، تهدیدی برای ورود بیماری در ایران به شمار می‌روند. در بررسی برومند فر و همکاران در مرز بین استان آذربایجان غربی و کردستان عراق تک سمیان آلوده توسط تکنیک‌های مالئیناسیون و الیزا شناسایی و معدوم شدند (۵ و ۴). در حال حاضر تشخیص مشمشه به روش مالئیناسیون و CF می‌باشد (۱۴). آزمایش مالئیناسیون نیاز به ۴۸

ساعت زمان داشته و از حساسیت بالایی برخوردار نمی‌باشد. از معایب تکنیک‌های سرولوژی نظیر CF امکان واکنش متقاطع بین بورخولدریا مالئی و بورخولدریا سودومالئی را می‌توان اشاره نمود (۱۲). با توجه به اینکه در نواحی مرزی کشور حتی اگر یک مورد بیماری مشاهده شود همه اسب‌ها را معدوم می‌نمایند که این باعث از بین رفتن جمعیت ارزشمند کشور می‌گردد. لذا برای جلوگیری از خسارت اقتصادی نیازمند تست سریع با حساسیت و ویژگی قابل قبول می‌باشیم. در این راستا، از تکنیک لکه‌گذاری نقطه‌ای در جهت سرعت بخشیدن برای تشخیص مشمشه استفاده گردید.

مواد و روش کار

در این مطالعه از سویه تولیدی بورخولدریا مالئی Razi 325 با شماره شناسایی (RTCC:2375) استفاده شد.

جمع آوری نمونه‌ها

از دی تا اسفند ۱۳۹۶ تعداد ۴۰ نمونه خون از ورید ثلث تحتانی گردن اسب‌های استان‌های آذربایجان شرقی، اصفهان، بوشهر، فارس، گلستان و مرکزی توسط سازمان دامپزشکی اخذ و به آزمایشگاه رفرانس توبرکولین موسسه واکسن و سرم سازی رازی منتقل گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰g-۱۰۰۰ سانتیفریوژ شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری گردیدند.

همچنین از سرم دو اسب سالم که در فواصل سه هفته برای چهار بار خونگیری شده و با استفاده از تست های الیزا و CF که به صورت روتین در آزمایشگاه رفرانس توبرکولین انجام می‌شود، از نظر تیتراژ آنتی بادی تایید شدند (بدون تیتراژ آنتی بادی در سرم کنترل منفی) و از سرم دو اسب که با تزریق آنتی ژن به ترتیب زیر حساس شده بودند، جهت کنترل مثبت استفاده گردید (افزایش تیتراژ آنتی بادی).

استفاده از آزمون لکه گذاری نقطه‌ای با پیکره بورخولدریا مالئی... ۴۷

تهیه نمونه سرم کنترل مثبت

از سویه تولیدی بورخولدریا مالئی سوسپانسیونی با سرم فیزیولوژی تهیه و در محیط نوترینت گلیسرینه کشت داده شد. پس از رشد، سوسپانسیونی از باکتری معادل رقت لوله یک مک فارلن تهیه و یک میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی به خو کچه هندی تزریق شد. پس از سه تا پنج روز مایع حاوی باکتری از بیضه جدا گردیده و در محیط کشت ژلوز گلیسرینه تلقیح گردید. پس از رشد به منظور تأیید، کلونی‌ها در محیط کشت‌های افتراقی TSI، SIM و موتیلیتی و کیت API20 NE تلقیح گردیدند. همچنین پس از

استخراج DNA به روش ایزوآمیل الکل کلروفرم (۱۲) از آزمون PCR توسط پرایمرهای BimA و flip جهت تأیید نهایی استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. پس از تأیید سوسپانسیونی از باکتری تهیه و به صورت داخل صفاقی به خو کچه هندی تزریق شد. ادامه مشابه مراحل قبل تکرار شد تا آنتی ژن سه بار حاد تهیه گردید. جهت تأیید بورخولدریا مالئی از این نمونه DNA استخراج و آزمون PCR توسط پرایمرهای فوق‌الذکر انجام گرفت.

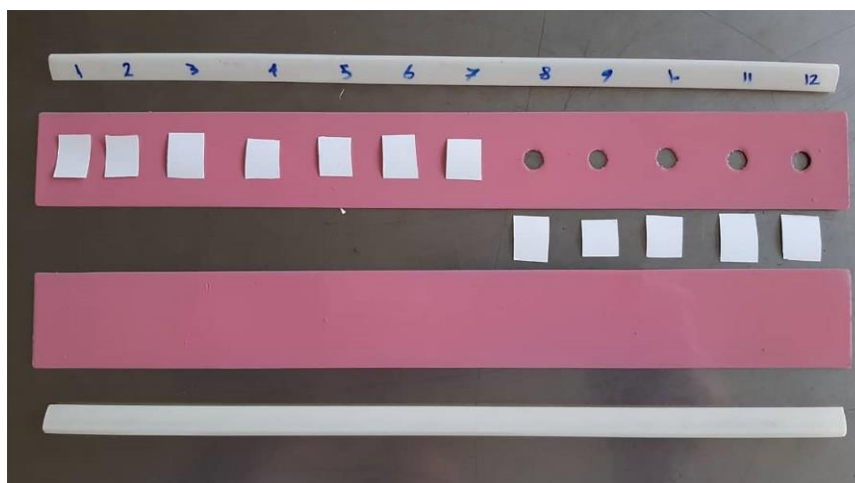
جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در تعیین هویت مولکولی سویه مرجع بورخولدریا مالئی

منبع	توالی پرایمرها (3'-5')	ژن	پرایمر
(18)	5-TCAGGTTTGTATGTCGCTCGG-3	flip	Bma-IS407-flip-f
(18)	5-CTAGGTGAAGCTCTGCGGAG-3	flip	Bma-IS407-flip-r
(18)	5-TTCGATCGATTCTGCTATC-3	BimA	BimA
(18)	5-GCGTTAAACGCCGTACTTTC-3	BimA	BimA

تهیه کاست متصل به غشاء با شارژ خنثی جهت آزمون لکه گذاری نقطه‌ای

دو ورق هم اندازه پلاستیکی را بر روی هم گذاشته و ورق رویی با فواصل معینی از هم سوراخ گردید. ممبرن نیترو سلولوز شارژ خنثی به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر در ۰/۵ سانتی‌متر به تعداد چاهک‌ها برش داده سپس هر کدام از برش‌های ممبرن بر روی چاهک‌ها قرار گرفته و صفحه زیرین کاست بر روی آن قرار گرفت و دو صفحه به وسیله گیره به یکدیگر متصل شدند. (تصویر ۲ و ۱)

به دو راس اسب دو میلی‌لیتر از این سوسپانسیون همراه با ادجوانت ناقص در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ به صورت زیر جلدی تلقیح و پس از خونگیری از سرم آن تست الایزا و CF انجام گردید که منجر به افزایش تیتراژ آنتی بادی گردید. از این سرم‌ها به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.



تصویر ۱ و ۲- کاست تهیه شده برای آزمون لکه گذاری نقطه ای

آزمون لکه گذاری نقطه ای

رقت مناسب آنتی بادی سرم و آنتی ژن با روش تیتراسیون چکر بورد با استفاده از نمونه های سرم کنترل مثبت و منفی تعیین گردید. اپتیمم رقت آنتی ژن (حدود ۲ میکروگرم در میلی لیتر پیکره باکتری) بر روی کاغذ نیتروسلولوز (Nagel-Macherey Germany) کاست گردید. کاست در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت در کنار پلیت حاوی آب مقطر قرار گرفت. پس از زمان فوق الذکر چاهک ها با PBS (pH: 7.2) حاوی توئین ۰/۰۵ درصد شستشو

داده

شدند. در مرحله بعد محلول بلاکینگ BSA ۳ درصد در بافر فسفات-توئین (7.2: pH) روی چاهک ها ریخته و به مدت سه ساعت داخل سردخانه قرار گرفت. پس از گذشت سه ساعت مجدداً شستشو با PBS انجام گردید. در مرحله بعد رقت ۱/۶۴ (اپتیمم رقت آنتی بادی) از سرم کنترل مثبت در چاهک اول و سرم کنترل منفی در چاهک آخر و در بقیه چاهک ها نمونه تست ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در سردخانه انکوبه گردید.

پس از گذشت این زمان چاهک ها با PBS توئین دار شسته و به آن آنتی بادی کونژوگه (HRP conjugated rabbit anti-horse IgG).

گردید. تصویر ۴ نتایج لکه گذاری نقطه ای یکی از کاست ها را نشان می دهد.

در این بررسی از ۴۰ نمونه، شش مورد مثبت مشمشه در استان های اصفهان، بوشهر، فارس و گلستان شناسایی



تصویر ۴- لکه گذاری نقطه ای کنترل مثبت و منفی و دو نمونه آلوده به بورخولدریا مالئی

نتایج اطلاعات مربوط به آزمون ها در جداول ۲ و ۳ آورده شده است.

استفاده از آزمون لکه گذاری نقطه‌ای با پیکره بورخولدریا مالئی... ۵۱

جدول ۲: نتایج آزمون‌های لکه‌گذاری نقطه‌ای و مالتیناسیون در نمونه‌های سرم از اسپداری‌های استان‌های مختلف ایران

شماره نمونه	استان	مالتیناسیون	لکه‌گذاری نقطه‌ای
۱	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۲	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۳	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۴	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۵	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۶	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۷	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۸	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۹	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۱۰	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۱۱	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۱۲	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۱۳	آذربایجان شرقی	منفی	منفی
۱۴	اصفهان	منفی	مثبت
۱۵	اصفهان	منفی	منفی
۱۶	اصفهان	منفی	مثبت
۱۷	اصفهان	منفی	مثبت
۱۸	اصفهان	منفی	منفی
۱۹	اصفهان	منفی	منفی
۲۰	اصفهان	منفی	منفی
۲۱	اصفهان	منفی	منفی
۲۲	اصفهان	منفی	منفی
۲۳	اصفهان	منفی	منفی
۲۴	اصفهان	منفی	منفی
۲۵	اصفهان	منفی	منفی
۲۶	اصفهان	منفی	منفی
۲۷	اصفهان	منفی	منفی
۲۸	اصفهان	منفی	منفی
۲۹	بوشهر	مثبت	مثبت
۳۰	بوشهر	منفی	منفی
۳۱	بوشهر	منفی	منفی
۳۲	بوشهر	منفی	منفی
۳۳	فارس	مثبت	مثبت
۳۴	فارس	منفی	منفی
۳۵	فارس	منفی	منفی
۳۶	فارس	منفی	منفی
۳۷	گلستان	مثبت	مثبت
۳۸	گلستان	منفی	منفی
۳۹	گلستان	منفی	منفی
۴۰	مرکزی	منفی	منفی

جدول ۳- نتایج آنالیز برای آزمون‌های مالتیناسیون و لکه‌گذاری نقطه‌ای

لکه‌گذاری نقطه‌ای			تست مالتیناسیون
+	-		
۳ مثبت کاذب	۳۴ منفی واقعی	-	
۳ مثبت واقعی	۰ منفی کاذب	+	

نتایج آنالیز آماری مالتیناسیون و لکه‌گذاری نقطه‌ای توسط آزمون زیر مجموعه کای اسکوار (آزمون مک نمار) نشان داد که تفاوت بین دو تست معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$) (جدول ۴ و ۵).

جدول ۴- نتایج آنالیز آماری زیر مجموعه کای اسکوار (مک نمار) برای آزمون‌های مالتیناسیون و لکه‌گذاری نقطه‌ای

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	18.378 ^a	1	.000		
Continuity Correction ^b	11.878	1	.001		
Likelihood Ratio	12.993	1	.000		
Fisher's Exact Test				.002	.002
Linear-by-Linear Association	17.919	1	.000		
McNemar Test ^b				.250 ^c	
N of Valid Cases	40				

جدول ۵- نتایج آنالیز آماری مک نمار برای آزمون‌های مالتیناسیون و لکه‌گذاری نقطه‌ای

Chi-Square Tests	
Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test	.250 ^a
N of Valid Cases	40
a. Binomial distribution used.	

فارس و کردستان و همچنین با توجه به انتقال مسمشه از همسایگان شرقی و غربی به ویژه کشورهای عراق و ترکیه تهدیدی بالقوه برای ایران محسوب می‌شود. برومند فر و همکاران در مرز بین استان آذربایجان غربی و کردستان عراق مواردی از بیماری را شناسایی و گزارش نمودند (۴, ۵) که ضرورت پرداختن به تشخیص سریع این باکتری را دو چندان می‌کند. قطعی‌ترین روش شناسایی این باکتری جداسازی عامل بیماری می‌باشد که با توجه به خطرات آن در حال

با در نظر گرفتن مالتیناسیون به عنوان آزمون استاندارد و مقایسه آن با لکه‌گذاری نقطه‌ای به ترتیب حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری منفی به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۱/۹٪ و ۱۰۰٪ شد.

بحث و نتیجه گیری

بورخولدريا مالتی عامل بیماری مسمشه بوده که در سال‌های اخیر به دلیل گسترش گروه‌های تندروری مذهبی در منطقه خاورمیانه اخیر و همچنین گزارش اپیدمی‌ها در نواحی خاصی از کشور به عنوان مثال

استفاده از آزمون لکه گذاری نقطه‌ای با پیکره بورخولدریا مالئی... ۵۳

نقطه‌ای، در حیواناتی که تحت آزمون مالئیناسیون قرار می‌گیرند ممکن است تا ۶ هفته آزمون لکه گذاری نقطه‌ای مثبت شود. از مزایای دیگر این آزمون، تیتربالای آنتی‌بادی پس از زمان کوتاهی از آلودگی می‌باشد که برای حداقل هفت هفته دوام دارد (۲، ۸). در بررسی Wongratanacheewin و همکارانش در سال ۱۹۹۵ بر روی ELISA و دات ایمونواسی مشخص گردید حساسیت و اختصاصیت دات ایمونواسی بالاتر از ELISA می‌باشد. لذا برای تشخیص موارد مثبت تست مناسب‌تری به نظر می‌رسد (۲۲).

مظلومی و همکاران در سال ۱۳۸۲ از ۱۵۰ رأس اسب و الاغ پس از انجام آزمون مالئیناسیون، نمونه‌های خون جمع‌آوری نموده و بر روی نمونه‌ها آزمون الایزای نقطه‌ای انجام دادند که تمام آن‌ها آزمایش مالئیناسیون منفی داشتند. از آن‌جا که در آزمایش ایمنی نقطه‌ای، عیارهای بالای ۱/۲۰۰ و بالاتر مشاهده نگردید، نتیجه گیری شد که بین مالئیناسیون و الایزای نقطه‌ای تطابق وجود داشته و می‌توان آزمایش الایزای نقطه‌ای که ازدیاد حساسیت تاخیری را می‌سنجد، را جایگزین مالئیناسیون نمود (۱).

در بررسی دیگری در سال ۲۰۰۰ توسط سرمسوان حساسیت لکه‌گذاری نقطه‌ای بالاتر از الایزا و هم‌گلو تیناسیون غیرمستقیم و کمتر از PCR بود. همچنین لکه‌گذاری نقطه‌ای ارزش پیشگویی منفی بالایی داشته (۱۶) که ارزش زیادی جهت تشخیص موارد منفی واقعی ایجاد می‌نماید.

در سال ۲۰۱۰ جان از این تکنیک با آنتی‌ژن‌های متنوع برای تشخیص مسمشه استفاده نمود. نتایج این بررسی نشان داد حساسیت تست لکه‌گذاری نقطه‌ای با آنتی‌ژنهای ثبوت عناصر مکمل ۱۰۰ درصد، با آنتی‌ژن

حاضر تشخیص مسمشه به روش مالئیناسیون انجام می‌شود که نیاز به ۴۸ ساعت زمان دارد.

با توجه به اینکه شهرهای مرزی توان نگاه‌داری اسب‌های مشکوک را ندارند، حتی اگر یک مورد بیماری مشاهده شود همه اسب‌ها را معدوم می‌نمایند که این باعث از بین رفتن جمعیت ارزشمند کشور می‌گردد. از سوی دیگر تزریق و قرائت نتیجه آزمون باید توسط فرد متخصص انجام شود. در غیر این صورت باعث آسیب به اسب می‌شود.

ورما و همکاران لکه‌گذاری نقطه‌ای را با استفاده از آنتی‌ژن‌های بورخولدریا برای تشخیص مسمشه استاندارد نمودند (۲۰) و با تغییراتی استاندارد سازی تکنیک توسط جان در سال ۲۰۰۸ انجام شد (۹). در بررسی ورما این تکنیک با فیکساسیون کمپلمان و هم‌گلو تیناسیون غیرمستقیم و کانترایمونو الکتروفوریز مقایسه شد. نتایج نشان داد، لکه‌گذاری نقطه‌ای بالاترین حساسیت را نسبت به سایر آزمون‌ها داشته، سریع بوده از سوی دیگر انجام تست برای کاربر آسان بوده و نیاز به تجهیزات خاصی ندارد (۱۷). همچنین میزان پایین آنتی‌بادی را نسبت به آزمون‌های دیگر مشخص می‌نماید (۲۰ و ۲۱) از سویی تیتربال لکه‌گذاری نقطه‌ای برای زمان طولانی‌تری مثبت باقی می‌ماند (حتی در یازدهمین هفته) در حالی که تیتربال فیکساسیون کمپلمان و هم‌گلو تیناسیون غیرمستقیم و مخصوصا کانترایمونو الکتروفوریز سریع‌تر کاهش پیدا می‌کند.

همچنین وجود فاکتورهای ضد کمپلمان یا سایر فاکتورهایی که باعث نتایج منفی کاذب در ثبوت مکمل می‌شوند، در این تست تاثیر گذار نمی‌باشد. البته با توجه به تداخل تست مالئیناسیون با لکه‌گذاری

منابع

- 1- Akbarin, H. D., Bahonar, A., Dabbagh Moghaddam, A., Bloki, Z., Hosseini, J. (2013). New look glanders, ancient biological weapons, *Journal of Military Medical Sciences, Iran*, **10**: 143-162. (In Farsi).
- 2- Al-Ani, F. (1993). A micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibody to *Pseudomonas mallei* infection in horses, *Pakistan Veterinary Journal*, **13**: 70-73.
- 3- Bazargani, T., Tadjbakhsh, H., Badii, A., Zahraei, T. (1996). The outbreak of glanders in some racehorses in three states of Iran, *Journal of Equine Veterinary Science*, **16**: 232-236.
- 4- Broumandfar, S. (2015). Equids notifiable diseases monitoring and surveillance system in Iran. The 3th international congress of large animal practitioners. 41-45.
- 5- Broumandfar, S., Rezae, A. (2012). Glanders situation in Iran. OIE Regional Conference of Glanders in Dubai, United Arab Emirates. 23-25.
- 6- Firouzbaksh, G. (1960). The current situation of Glanders in Iran. DVM thesis. University of Tehran, Iran.
- 7- Godoy, D., Randle, G., Simpson, A. J., Aanensen, D. M., Pitt, T. L., Kinoshita R., Spratt, B. G. (2003). Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*, *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 2068-2079.
- 8- Hussain, M. H. (2011). Sero-survey of equine infectious anemia, glanders and piroplasmiasis in five draught equine populated urban areas of Punjab. PhD thesis. University of agriculture faisalabad, Pakistan.
- 9- John, J. M. (2008). Studies on Serodiagnosis of glanders using various antigens. M.V.Sc thesis. CCS Haryana Agricultural University, Hisar.
- 10- John, J. M., Kapoor, P., Malik, P. (2010). Serodiagnosis of glanders by Dot-ELISA using various antigens, *Indian Journal of Animal Sciences*, **80**: 1084-1086.
- 11- Khaki, P., Mosavari, N., Khajeh, N. S., Emam, M., Ahouran, M., Hashemi, S., Taheri, M. M., Jahanpeyma, D., Nikkhah, S. (2012). Glanders outbreak at Tehran Zoo, Iran, *Iranian Journal of Microbiology*, **4**: 3-7.

نوترکیب ۹۰/۹۱ درصد و با پروتئین خالص شده مالئین ۹۷/۴۷ درصد بود (۱۰). از مزایای دیگر این تکنیک امکان انجام این تست در فیلد می‌باشد. همچنین لکه گذاری نقطه‌ای در تشخیص بیماری‌های متنوع اختصاصی عمل می‌نماید و زمینه (بک گراند) کمی در مقایسه با الایزا ایجاد می‌نماید که می‌توان به آسانی بین موارد مثبت و منفی تمایز ایجاد نمود.

این روش ساده‌ترین، سریع‌ترین و اقتصادی‌ترین آزمایش تشخیصی برای تعداد زیادی نمونه سرم است. دقت این روش زیاد بوده لذا به دلیل سرعت و سهولت کار و تفسیر آسان بر سایر روشها برتری دارد (۱۵).

نتیجه گیری کلی

در این بررسی نیز مشابه بررسی‌های گذشته، تست لکه گذاری نقطه‌ای سریع و دارای حساسیت و ارزش اخباری منفی بالا بوده و نیاز به تجهیزات خاصی ندارد و قابلیت کاربرد در فیلد را داشته بنابراین پیشنهاد می‌شود در صورت تایید مرجع ذیصلاح (سازمان دامپزشکی کشور) از این تکنیک برای تشخیص و معدوم‌سازی سریع موارد مشکوک به ویژه در مناطق مرزی کشور استفاده شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه از نظر مالی توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مورد حمایت قرار گرفته است. از تمام پرسنل بخش تحقیق و تولید تویرکولین و مالئین که در این تحقیق همکاری نمودند کمال تشکر و سپاس گذاری را داریم.

- 18- Ulrich, R. L., Ulrich, M. P., Schell, M. A., Kim, H. S., DeShazer, D. (2006). Development of a polymerase chain reaction assay for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and other closely related Burkholderiaceae, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **55**: 37-45.
- 19- Van Zandt, K. E., Greer, M. T., Gelhaus, H. C. (2013). Glanders: an overview of infection in humans, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **8**: 131-138.
- 20- Verma, R., Mishra, V. (1989). Research on epizootic diagnosis and control of glanders with a view to eradicate the disease from India, *Project Closure Reported Submitted ICAR, Ministry of Agriculture, Govt of India, New Delhi*: 1-54.
- 21- Verma, R., Sharma, J., Venkateswaran, K., Batra, H. (1990). Development of an avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines, *Veterinary Microbiology*, **25**: 77-85.
- 22- Wongratanacheewin, S., Amornpant, S., Sermswan, R., Tattawasart, U., Wongwajana, S. (1995). Use of culture-filtrated antigen in an ELISA and a dot immunoassay for the diagnosis of melioidosis, *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **26**: 329-334.
- 12- Khan, I., Wieler, L.H., Saqib, M., Melzer, F., Santana, V.L., Neubauer, H., Elschner, M.C. (2014). Effect of incubation temperature on the diagnostic sensitivity of the glanders complement fixation test. *Revue scientifique et technique*, **33**:869-75.
- 13- Merk, S., Neubauer, H., Meyer, H., Greiser-Wilke, I. (2001). Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste water, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **204**: 127-131.
- 14- Office International des Epizooties (OIE), 2. 5. 11. OIE Terrestrial Manual, OIE. 2008. Paris, France.
- 15- Rowland, C. A., Lever, M. S., Griffin, K. F., Bancroft, G. J., Lukaszewski, R. A. (2010). Protective cellular responses to *Burkholderia mallei* infection, *Microbes and Infection*, **12**: 846-853.
- 16- Sermswan, R. W., Wongratanacheewin, S., Anuntagool, N., Sirisinha, S. (2000). Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **63**: 146-149.
- 17- Sprague, L. D., Zachariah, R., Neubauer, H., Wernery, R., Joseph, M., Scholz, H. C., Wernery, U. (2009). Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses, *BMC Veterinary Research*, **5**: 32.

Use of Dot-blot technique by *Burkholderia mallei* for the serodiagnosis of glanders in Iran

Saeed Mohammad Hoseini¹, Nader Mosavari*², Lida Abdolmohammadi khiav³

1- M.Sc, Department of Bovine Tuberculosis Reference, Razi Vaccine and Serum Research Institute Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Bovine Tuberculosis Reference, Razi Vaccine and Serum Research Institute Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3- Graduated from Ph.D. Bacteriology, Department of anaerobic bacterial vaccine Production and Research, Clostridia Research laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 10 July 2019

Accepted: 26 February 2020

Abstract

Glanders is one of the most important zoonotic diseases that caused by *Burkholderia mallei*. Considering that Iran as the major center for glanders and risks of transmission of it, quick detection is very important. Therefore, the aim of this study is designing of Dot-Elisa system. So, 40 serum samples were collected from different provinces, along with antigen sample of *Burkholderia mallei* as positive control and healthy horses' serum (negative control) was used. The optimum concentrations of antigen-antibody were determined by checkerboard titration using glanders positive and negative horse sera. After designing the dot-blot test, an antigen was coated into the nitrocellulose membrane wells and stopped by blocking solution and the suspicious equine serum was poured into the wells along with positive and negative control. In the following conjugated antibody was added on it, finally substrate was added to the wells and reaction was read as color signal. In this study, out of 40 samples, 6 positive cases were positive. Considering mallein test as a standard test and comparing with Dot-Elisa, the sensitivity and specificity were 100% and 91.9% respectively. The results showed that dot-blot test was successful for detection of Glanders due to its high sensitivity, speed, readability and field applicability.

Key Words: *Burkholderia mallei*, Glanders, Dot- blot, Diagnosis

*Corresponding Author: Nader Mosavari

Address: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Department of Bovine Tuberculosis Reference, Alborz, Karaj

Tel: 026-34570038

E. mail: n.mosavari@rvsri.ac.ir