Archive of SID

DOI: 10.22092/vj.2018.122682.1474
شماره ۱۲۳ تابستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

شناسایی و تعیین هویت مولکولی باکتری بورخولدریا مالئی جدا شده از نمونه‌ی خون اسب مبتلا به مشمشه

• **سجاد یزدان‌ستاد**
گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• **نادر مصوری (نویسنده مسئول)**
بخش توبرکولین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **کیوان تدین**
بخش واکسن های باکتریایی هوازی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **ایرج مهرگان**
گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۵-۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۷-۰۳
Email: nmosavari@gmail.com

چکیده

بورخولدریا مالئی عامل اتیولوژیک بیماری زئونوزی مشمشه، یکی از خطرناک‌ترین و قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیردار در تک‌سمیان است. کشور ایران به عنوان کانون مشمشه در دنیا شناخته شده است. مطالعهٔ حاضر به‌منظور جداسازی باکتری بورخولدریا مالئی از نمونهٔ خون یک مورد اسب مبتلا به مشمشه در منطقهٔ اشنویه آذربایجان غربی در دهه گذشته و تعیین هویت مولکولی ارگانیسم با استفاده از ژن‌های اختصاصی *IS407-flip*، *BimA* و 23S rRNA انجام گرفت. نمونهٔ خون اسب مبتلا به مشمشه در محیط دی‌فازیک حاوی بویون و ژلوز گلیسیرینه همراه با آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. بورخولدریا مالئی با آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و خالص‌سازی شد. ایزولهٔ باکتری با تزریق به میزبان حساس و بررسی علائم پاتوبیولوژیکی آن، تایید شد. تعیین هویت ایزولهٔ کلینیکی بورخولدریا مالئی بر اساس تکثیر و تعیین توالی ژن‌های اختصاصی *IS407-flip*، *BimA* و 23S rRNA باکتری انجام گرفت. بورخولدریا مالئی از نمونهٔ خون اسب مبتلا به مشمشه جداسازی و شناسایی شد. حدود ۷۲ ساعت متعاقب تزریق سوسپانسیون باکتری بصورت درون‌صفاقی به خوکچه هندی نر و کلونیزاسیون باکتری در بافت بیضه، علامت بارز تورم بیضه در حیوان مشاهده شد. تکثیر قطعات *IS407-flip*، *BimA* و 23S rRNA محصولات مورد انتظار در اندازه‌های به ترتیب 989، 250 و 526 جفت باز را نشان داد. بورخولدریا پسودومالئی و پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. گزارش مشمشه هشداری برای مراقبت‌های بیشتر نهادهای بهداشتی است. با توجه به مشکلات تشخیص سریع و دقیق عامل عفونی مشمشه، شناسایی ارگانیسم با استفاده از ژن‌های اختصاصی *IS407-flip*، *BimA* و 23S rRNA مطابق با استانداردهای تشخیصی سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) صورت گرفت.

کلمات کلیدی: بورخولدریا مالئی، *IS407-flip*، *BimA*، مشمشه

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 123 pp: 2-10

Detection And Molecular Identification Of *Burkholderia mallei* Isolated From Blood Specimen Of An Infected Horse With Glanders

By: Yazdansetad S., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Mosavari N. (Corresponding Author), Department of Tuberculin and Mallein, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Tadayon K., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mehregan I., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 2018-07-29 **Accepted: 2018-09-25**

Email: nmosavari@gmail.com

Burkholderia mallei is a causative agent of glanders, a zoonotic disease and one of the most dangerous and oldest contagious diseases in equidae. Iran has still been recognized as the major center for glanders. The present study was conducted to isolate *B. mallei* from blood specimen of an infected horse with glanders reported from Oshnavieh-West Azerbaijan in the past decade and molecular identification based on specific genes *BimA*, IS*407-flip*, and 23S rRNA.The blood sample of infected horse were cultured in biphasic medium containing nutrient broth and nutrient agar supplemented with glycerin and antibiotic. The bacterial isolate was identified by biochemical tests. The isolate was inoculated to male guinea pig intraperitoneally as a sensitive host for pathobiological studies. *B. mallei* isolate was verified by PCR and sequencing of *BimA*, IS*407-flip*, and 23S rRNA genes. *B. mallei* was isolated from blood sample of infected horse. The major sign of testicular swelling was seen in the male guinea pig after about 72 h IP inoculation with *B. mallei* and testicular colonization. The PCR amplification of *BimA*, IS*407-flip,* and 23S rRNA genes of *B. mallei* resulted in expected sizes of 989 bp, 250 bp, and 526 bp, respectively. *Burkholderia pseudomallei* and *Pseudomonas aeruginosa* were used as negative control.The report of glanders is alarming for healthcare organizations and need to monitor carefully. Due to the complication of diagnosis of glanders infectious agent, the identification of *B. mallei* using *BimA*, IS*407-flip*, and 23S rRNA is according to the diagnostic standards of World Organisation for Animal Health (OIE).

Key words: *Burkholderia mallei*, *BimA*, IS*407-flip*, glanders

مقدمه

باکتری بورخولدریا مالئی (*Burkholderia mallei*) باسیل گرم منفی و هوازی است که در گذشته در جنس سودوموناس قرار گرفته بود، اما بعداً با مطالعه‌ی تفاوت در سکانس نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA، تفاوت در ساختمان اسیدهای چرب و لیپید دیواره‌ی باکتری به جنس جدید و مستقل بورخولدریا تغییر یافت (۴). این ارگانیسم عامل اتیولوژیک مشمشه (Glanders) یکی از خطرناک‌ترین و قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیردار در تک‌سمیان (اسب، الاغ، قاطر) است. بیماری عموماً به فرم ندول‌های جلدی (Farcy) و زخم در دستگاه تنفس فوقانی و ریه‌ها تظاهر پیدا می‌کند (۱۳). اهمیت این بیماری در انتقال به انسان در موارد تماس با حیوانات آلوده و یا هر گونه مواجه شدن با عامل عفونی به‌ویژه در موارد شغلی همچون مربیان اسب، دامپزشکان، قصابان و کارکنان آزمایشگاه‌ها موجب شده که مشمشه بیماری زئونوز (Zoonosis) مورد توجه جامعه جهانی باشد. انتقال عامل عفونی از راه تنفسی، مجاری گوارشی، مخاط چشم، خراش‌های پوستی صورت می‌گیرد. انتقال آلودگی به محیط نیز از طریق ترشحات بینی، بزاق، زخم‌های پوستی و یا لاشه‌ی حیوانات تلف شده صورت می‌گیرد (۱۸). مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC)، بورخولدریا مالئی را به‌دلیل ویژگی‌های خاص نظیر توان انتقال از طریق آئروسل، فقدان واکسن مناسب و مقاومت ذاتی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در رده‌ی B عوامل تهدید زیستی قرار داده است (۳). مشمشه همراه شاربن به‌عنوان اولین سلاح میکروبی مورد استفاده در

www.SID.ir

Archive of SID

جریان جنگ جهانی اول بودند (۱۱). ایران به‌دلیل موقعیت جغرافیایی و واقع شدن در همسایگی کشورهایی با شیوع بالای بیماری مشمشه همچون افغانستان، پاکستان و عراق، ناخواسته در مسیر ورود این عامل عفونی قرار دارد. علیرغم اینکه نهادهای بهداشتی، کنترل و ریشه‌کنی این بیماری را از ۶۰ سال پیش تاکنون در برنامه‌ی خود قرار دادند، ایران همچنان مانند برخی دیگر از کشورهای خاورمیانه به‌عنوان یک کانون پایدار اندمیک مشمشه در جهان شناخته می‌شود (۵). تشخیص دقیق و سریع بورخولدریا مالئی با توجه به بومی نبودن ارگانیسم، شباهت فنوتیپی آن با جنس‌های وابسته (Pseudomonas spp.)، احتمال ورود ارگانیسم از کشورهای همسایه با ورود تک‌سمی‌های غیرمجاز به ایران، احتمال تهاجم این عامل عفونی به‌عنوان تهدید زیستی و لزوم توجه به پدافند غیرعامل به‌منظور کنترل و کاهش خسارت‌های احتمالی در کشور از اهمیت خاصی برخوردار است (۶). در این بین، تست‌های مولکولی بر اساس هدف قرار دادن ژن‌های اختصاصی ارگانیسم دارای دقت و اختصاصیت بالا است. مطالعه‌ی حاضر به‌منظور جداسازی باکتری بورخولدریا مالئی از نمونه‌ی خون یک مورد اسب مبتلا به بیماری مشمشه در منطقه‌ی اشنویه آذربایجان غربی و تعیین هویت مولکولی ارگانیسم با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی بر پایه‌ی تکثیر ژن‌های اختصاصی *IS407-flip*، *BimA*، و 23S rRNA انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری

اداره‌ی دامپزشکی استان آذربایجان غربی گزارشی را در دهه گذشته مبنی بر احتمال ابتلا چندین اسب بارکش به بیماری مشمشه در منطقه‌ی مرزی اشنویه آذربایجان غربی با مختصات محل جغرافیایی "34.522 2' 37° مشروح در سیستم DMS، به آزمایشگاه رفرانس مالئین موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج ارائه داد. با مراجعه به محل و معاینات اولیه تعداد ۱۹۷ اسب مشکوک به بیماری و تست تزریق آنتی‌ژن مالئین خام بین جلدی در پلک پایین (Intradermo-palpebral) حیوان جهت تشخیص اولیه بیماری، تعداد ۶ اسب مبتلا به مشمشه شناسایی و نمونه‌برداری از خون انجام گرفت. نمونه‌ها در محیط دی‌فازیک حاوی بویون (مایع نوترینت) و ژلوز گلیسیرینه همراه با آنتی‌بیوتیک جهت انتخابی کردن محیط، کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری گردید (۱۹).

شناسایی بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

کلنی‌های باکتری بر روی محیط نوترینت آگار (ژلوز) گلیسیرینه حاوی ۴٪ گلیسیرین از لحاظ مورفولوژیکی، میکروبیولوژیکی و رنگ‌آمیزی گرم بررسی گردید و پس از اطمینان از خلوص باکتری، در محیط آگار خوندار کشت داده شده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. شناسایی اولیه‌ی باکتری با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، TSI (Triple Sugar Iron Agar)، SIM (Sulfide-Indole-Motility)، تولید ایندول و گاز، احیای نیترات، اکسیداسیون گلوکز و لاکتور و نیز آزمون مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین و پلی‌میکسین B انجام گرفت. جهت تأیید نتایج از استریپ‌های تجاری API® 20E (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) نیز بصورت توام استفاده شد. استریپ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری و شناسایی باکتری بر اساس آنالیز واکنش رنگی استریپ‌ها انجام گرفت. سویه‌ی استاندارد (RTCC 2375) *Burkholderia mallei* Razi 325 نیز به‌عنوان سویه‌ی استاندارد در نظر گرفته شد. این سویه‌ی غیر بومی آزمایشگاهی، سویه‌ی تولیدی انبوه آنتی‌ژن مالئین موسسه رازی ایران بوده و در سال ۱۹۵۶ میلادی توسط آزمایشگاه همکار از کشور سوئد وارد موسسه شده است.

تزریق ایزوله‌ی خالص شده‌ی باکتری به حیوان آزمایشگاهی

کلنی‌های تازه و خالص باکتری از محیط آگار خون‌دار به بافر فسفات (PBS 0.01 M, pH 7.4) تلقیح شد و از سوسپانسیون حاصل با غلظت 10^7 CFU/ml و مقدار ۱ میلی‌لیتر بصورت درون‌صفاقی (IP) به خوکچه‌ی هندی نر در محدوده‌ی وزنی ۴۰۰-۳۵۰ گرم تزریق شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات نیز بصورت جداگانه و به عنوان کنترل منفی به خوکچه تزریق شد. خوکچه‌ها در قفس‌های جداگانه در ایزولاتور قرار گرفته و تورم بیضه‌ی حیوان بعد از ۷۲-۴۸ ساعت از نظر بروز پدیده‌ی اشتراوس (Strauss reaction) مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). جهت حصول اطمینان از باکتری مسبب پدیده اشتراوس، مجدداً بورخولدریا مالئی از بیضه‌ی خوکچه هندی جداسازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت.

استخراج DNA باکتری

استخراج DNA باکتری با روش فنل-کلروفرم انجام گرفت. بطور خلاصه، سوسپانسیون باکتری‌ها با لیزوزیم (10 mg/ml) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرماگذاری شدند و تخریب دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها با استفاده از پروتئیناز K، SDS ۱۰ درصد در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. گرماگذاری بعدی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با CTAB/NaCl انجام گرفت و محلول‌سازی DNA با استفاده از مخلوط فنل-کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل به ترتیب به نسبت ۲۵، ۲۴، و ۱ میکرولیتر انجام شد و در نهایت DNA ژنومی با استفاده از ایزوپروپانول سرد ترسیب و با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. رسوب DNA در بافر EDTA-Tris (1X TE) حل شد. DNA استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد و بافر TBE 1X به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰ ولت الکتروفورز و کیفیت‌سنجی شد. کمیت و غلظت DNA نیز با دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (ND-1000 UV/Vis, USA) تعیین شد. در نهایت، DNA استخراج شده تا زمان استفاده به فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال یافت.

تعیین هویت مولکولی به روش PCR

تعیین هویت ایزوله‌ی کلینیکی بورخولدریا مالئی بر اساس تکثیر و تعیین توالی ژن‌های اختصاصی *IS407-flip*، *BimA* و 23S rRNA باکتری انجام گرفت (۱۷). طراحی پرایمر برای هر یک از ژن‌ها با مراجعه به بانک اطلاعاتی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore) و انتخاب توالی‌های مرجع (NC_006348 و NC_006349) و با استفاده از نرم‌افزار AlleleID 7.84 انجام گرفت (جدول ۱). واکنش PCR با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

مسترمیکس تجاری آمپلیکون (Ampliqon®, Denmark) حاوی آنزیم *Taq* DNA پلیمراز و نشانگر رنگی قرمز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با محتوی ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۵ پیکومول از هر پرایمر فوروارد و ریورس در دستگاه ترمال‌سایکلر (PeQLab, Germany) در ۳۵ چرخه تکثیری با شرایط دمایی زیر انجام گرفت: مرحله‌ی واسرشت شدن رشته‌ها در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی اتصال در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گرد برای ژن *BimA*، دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گرد برای ژن IS*407-flip*، دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گرد برای ژن 23S rRNA و مرحله‌ی بسط و گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گرد به مدت ۱ دقیقه. محصولات تکثیر یافته در ژل آگارز ۲ درصد با بافر TBE 1X به مدت ۱ ساعت در ۸۰ ولت الکتروفورز شد. نهایتاً، محصولات تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن (MacroGen, Korea) ارسال شد. توالی‌های تعیین شده با نرم‌افزارهای Chromas Lite 2.0 و Clustal X 2.0.11 بررسی شدند.

نتایج

شناسایی ایزوله‌ی باکتری

پس از ۲۴ ساعت از کشت باکتری در محیط ژلوز گلیسیرینه و آگار خوندار (SBA)، کلنی‌های موکوئیدی گرد، صاف، محدب، خاکستری رنگ و نیمه‌شفاف رویت شد. مطالعات میکروسکوپی، باسیل و کوکوباسیل‌های گرم منفی صاف و بعضاً خمیده با دو طرف گرد را نشان داد. خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری در جدول ۲ و مطابقت نتایج با استریپ‌های تجاری API® 20E در شکل ۱ نشان داده شده است. حدود ۷۲ ساعت متعاقب تزریق سوسپانسیون باکتری بصورت درون‌صفاقی به خوکچه هندی نر و کلونیزاسیون باکتری در بافت بیضه، علامت بارز تورم بیضه در حیوان مشاهده شد (شکل ۲). مطالعات آناتومیکی و بافت‌شناختی از بیضه حیوان، ضایعات هیستوپاتولوژیکی ناشی از فعالیت پاتوژنیسیته باکتری را نشان داد (شکل ۳).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای اختصاصی قطعات تکثیری هدف

Target	Primer sequence (۳→'۵)	Amplicon size (bp)	Tm (°C)	Reference
BimA	F: TTC GAT CGA TTC CTG CTA TC	۲۵۰	۵۶	(۱۷)
IS*407-flip*	R: GCG TTA AAC GCC GTA CTT TC	۹۸۹	۶۵	(۱۷)
23S rRNA (Specific for Species)	F: TCA GGT TTG TAT GTC GCT CGG	۵۲۶	۵۸	(۱۷)
23S rRNA (Interspecies)	R: CTA GGT GAA GCT CTG CGC GAG	۱۰۵۱	۵۸	(۱۷)

جدول ۲- آزمون های بیوشیمیایی ایزولهٔ بورخولدریا مالئی

Biochemical Test	Status
Oxidase	Variable
Catalase	+
Growth at 42ºC	+
Nitrate reduction	+
Motility	-
Indole	-
TSI	No Change
H2S	-
Oxidation of lactose	-
Colistin/Polymyxin B	Resistant (no zone)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی ایزولهٔ بورخولدریا مالئی با استریپ تجاری API® 20E

(استریپ A: خصوصیات بیوشیمیایی سویهٔ استاندارد *Burkholderia mallei* Razi 325 ، استریپ B: خصوصیات بیوشیمیایی ایزولهٔ بورخولدریا مالئی)

شکل ۲- تورم بیضه خوکچه هندی نر (پدیده اشتراوس) ناشی از تزریق درون صفاقی بورخولدریا مالئی

www.SID.ir

Archive of SID

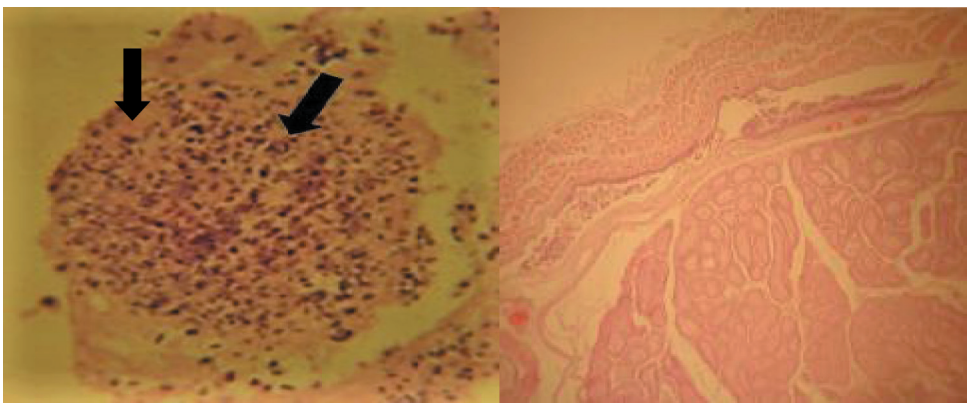
تعیین هویت ایزوله‌ی باکتری با روش PCR

تکثیر قطعات مربوط به *IS407-flip*، *BimA* و 23S rRNA اختصاصی ایزوله‌ی بورخولدریا مالئی محصولات مورد انتظار در اندازه‌های به ترتیب ۹۸۹، ۲۵۰ و ۵۲۶ جفت باز را نشان داد (شکل ۴ و ۵). بورخولدریا پسودومالئی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین تکثیر قطعه‌ی 23S rRNA مشترک بین گونه‌های جنس بورخولدریا اندازه مورد نظر ۱۰۵۱ جفت باز را نشان داد (شکل ۶). پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. توالی‌های تعیین شده‌ی قطعات تکثیر یافته، بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را به قطعات هم‌ارز موجود در سویه‌های استاندارد بورخولدریا مالئی (*Burkholderia mallei* NCTC 10229, NCTC10247, ATCC23344, SAVP1) نشان داد.

بحث

امروزه، مشمشه به عنوان مشکل بهداشتی جدی در کشورهای در حال توسعه مطرح است (۸). مشمشه به فرم‌های حاد و مزمن بروز پیدا می‌کند. شناخت این بیماری در میزبان‌های اختصاصی و به ویژه در اسب به جهت زئونوتیک بودن بیماری و احتمال انتقال آن به انسان حائز اهمیت است. علائم بالینی در مشمشه حاد در اسب شامل تب، زخم‌های جلدی، ندول‌های نکروتیک در کانال بینی همراه با ترشحات زرد رنگ چسبناک و عفونی است. در فرم جلدی مشمشه (Farcy) آبسه‌های پوستی و ندول‌های لنفاوی و زخم در مسیر لنف منجر به ترشحات چرکی و عفونی زرد رنگ می‌شود (۷ و ۱۳). در ایران از سال ۱۳۷۰ تاکنون بیشترین موارد مشاهده شده‌ی مشمشه به فرم تنفسی بوده که معمولا با علائم ترشحات موکوپورولانت از منخرین همراه با رال تنفسی و زخم منخرین و گاها ترشحات چرکی غلیظ به رنگ عسل بود (۵).

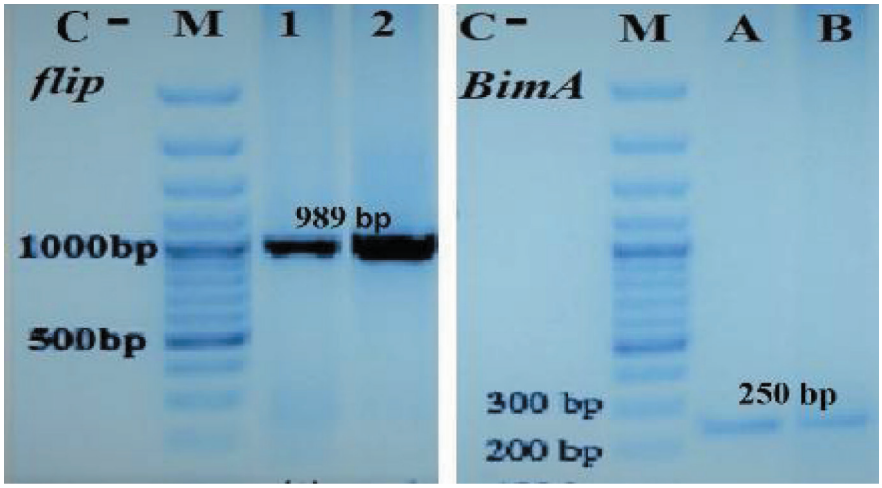
بر اساس اسناد موجود، در سال‌های ۱۳۱۱-۱۳۰۷ بیماری مشمشه در ایران شایع شد و قربانیان زیادی را از خود بر جای گذاشت و موجب وحشت عمومی مردم از این بیماری شد. با رواج اتومبیل و کم شدن کاربرد اسب در زندگی روزمره‌ی انسان و نیز اپیدمی حادث شده‌ی طاعون اسبی که باعث از بین رفتن جمعیت زیادی از اسب‌های کشور گردید، تلفات بیماری مشمشه در ایران کاهش یافت (۵). در سال ۱۳۵۲، آخرین آندمی مشمشه در ایران در منطقه‌ی دزلی کردستان رخ داد که موجب تلف شدن ۲۰۰ راس اسب و ۵ نفر انسان شد (۱۵). بعد از سال ۱۳۵۲ تا سال ۱۳۷۲ هیچ مورد بیماری در کشور گزارش نگردید. در سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۷۲، مجددا بیماری در کشور و در شهرهای تهران، اصفهان، ارومیه و جزیره‌ی کیش ظهور پیدا کرد (۵). با اینکه پیشینه‌ی جداسازی بورخولدریا مالئی در ایران به سال‌های ۱۳۲۷ و ۱۳۲۹ بر می‌گردد (۱۶)، اما اولین گزارش رسمی جداسازی گونه‌های بورخولدریا در سال ۱۳۴۹ توسط بهارصفت و همکاران در مورد میلوئیدوزیس (شبه مشمشه) اسبی و مادیان ارائه گردید (۱). در سال ۱۳۵۶ نیز اولین مورد میلوئیدوزیس انسانی به شکل پنومونی در ایران توسط پورتقوا و همکاران گزارش شد (۱۰). مردانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ به نقل از اداره‌ی مبارزه با بیماری‌های دامی سازمان دامپزشکی کشور اعلام کرد که موارد ابتلا به بیماری مشمشه در اسب‌های ایرانی از ۵ مورد در سال ۱۳۷۶ به ۵۰ مورد در سال ۱۳۸۹ رسید (۹). این مسئله، بازپدیدی این بیماری مشترک بین انسان و دام را نگران‌کننده کرده بود. تقی پور و همکاران در سال ۱۳۸۹ و خاکی و همکاران در سال ۱۳۹۰، مشمشه را در ببرهای سیبریایی ارسال شده به باغ وحش تهران گزارش کردند که منجر به مرگ و معدوم‌سازی سایر گوشت‌خواران جهت پیشگیری از انتشار بیماری در آن مرکز گردید (۵). ضعف تأمین هزینه‌های اجرای برنامه‌های کنترل و پیشگیری بیماری و فقدان امکانات آزمایشگاهی مناسب از عوامل شکست تشخیص مناسب و زودهنگام عامل عفونی مشمشه به ویژه در موارد مزمن بیماری است.



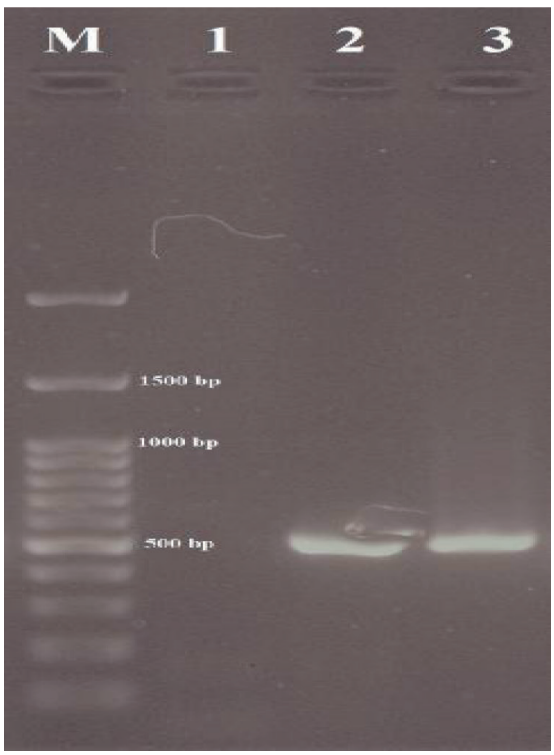
شکل ۳- ضایعات گرانولوماتوزی چرکی-التهابی و نفوذپذیری در اپیدیدم در برش مقطعی بافت بیضه خوکچهٔ هندی نر متعاقب ۷۲ ساعت از تزریق درون-صفاقی (IP) بورخولدریا مالئی (رنگ آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- تکثیر ژن‌های *IS407-flip* و *BimA* بورخولدریا مالئی در سایز ۲۵۰ bp برای ژن *IS407-flip* و سایز ۹۸۹ bp برای ژن *BimA*. سمت چپ، ستون C-: کنترل منفی (بورخولدریا پسودومالئی)، ستون M: سایز مارکر (SMOBiO, Taiwan) 100 bp plus، ستون ۱: تکثیر ژن *IS407-flip* ایزولهٔ بورخولدریا مالئی، ستون ۲: تکثیر ژن *IS407-flip* بورخولدریا مالئی325 Razi. سمت راست، ستون C-: کنترل منفی (بورخولدریا پسودومالئی)، ستون M: سایز مارکر (SMOBiO, Taiwan) 100 bp plus، ستون A: تکثیر ژن *BimA* بورخولدریا مالئی 325 Razi، ستون B: تکثیر ژن *BimA* ایزولهٔ بورخولدریا مالئی.



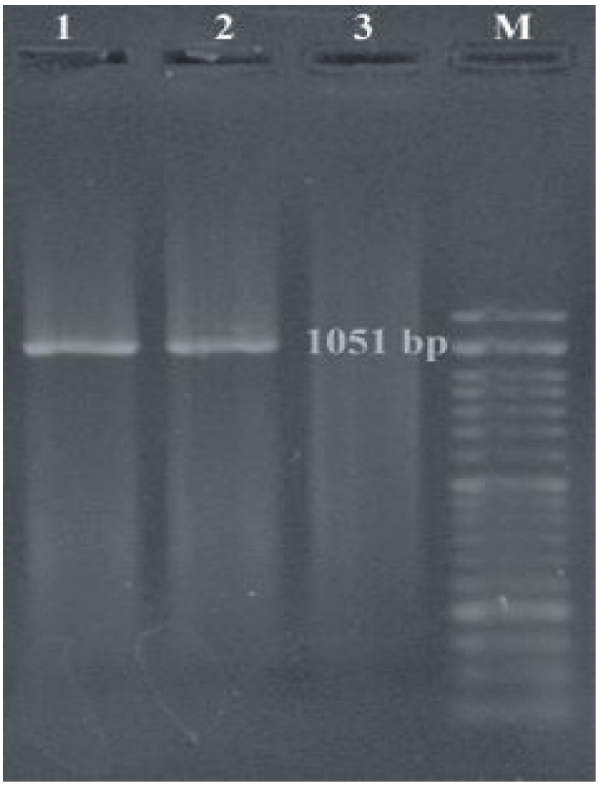
شکل ۵- تکثیر ژن 23S rRNA اختصاصی بورخولدریا مالئی در سایز ۵۲۶ bp. ستون M: سایز مارکر (bp plus-Fermentas ۱۰۰ O' Gene Ruller)، ستون ۱: کنترل منفی (Negative control)، ستون ۲: تکثیر ژن 23S rRNA بورخولدریا مالئی Razi ۳۲۵، ستون ۳: تکثیر ژن 23S rRNA ایزولهٔ بورخولدریا مالئی.

www.SID.ir

Archive of SID

از طرف دیگر، بروز جنگ و ناامنی‌های منطقه خاورمیانه، شیوع فزاینده آن در ده سال اخیر در ایران و نیز گزارش اپیدمی‌های نقطه‌ای در مناطق مختلف ایران، لزوم بکارگیری روش‌های تشخیصی سریع و دقیق عامل بیماری را می‌طلبد. بر این اساس، سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) در تدوین پروتکل‌های تشخیصی (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) این بیماری، روش‌های جدیدتر مولکولی را در آزمایشگاه‌های تخصصی پیشنهاد می‌کند. در حال حاضر، روش‌های مبتنی بر PCR در اغلب آزمایشگاه‌های رفرانس تحت نظارت OIE مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸).

در همه‌ی اعضای جنس بورخولدریا، قطعه‌ی 23S rRNA به طول ۱۰۵۱ جفت بازی وجود دارد که مشترک گونه‌ای است و برای افتراق این جنس از سایر جنس‌های مشابه استفاده می‌شود. بورخولدریا مالئی و بورخولدریا پسودومالئی از نظر ژنتیکی و هیبریداسیون DNA-DNA بسیار بهم نزدیک هستند و تفاوت‌های بسیار اندکی در ژنوم دارند. تفاوت نوکلئوتیدی در تیمیدین مقابل سایتوزین در نوکلئوتید ۲۱۴۳ در توالی 23S rDNA باکتری جهت افتراق بورخولدریا مالئی و بورخولدریا پسودومالئی از هم استفاده می‌شود (۱۷). برنفیند و همکاران با طراحی



شکل ۶- تکثیر ژن 23S rRNA مشترک گونه‌های بورخولدریا در سایز ۱۰۵۱ bp. ستون ۱: تکثیر ژن 23S rRNA مشترک ایزولهٔ بورخولدریا مالئی، ستون ۲: تکثیر ژن 23S rRNA مشترک بورخولدریا مالئی Razi 325، ستون ۳: کنترل منفی (*Pseudomonas aeruginosa*)، ستون M: سایز مارکر ۵۰ bp plus

لوکوس ۱۰۵۱ جفت‌بازی 23S rRNA بورخولدریا مالئی و بورخولدریا پسودومالئی، برای تفریق آنها از گونه‌های مشابه استفاده نمودند (۲). ژن *flip* بورخولدریا مالئی کد کننده‌ی پروتئین فلاژلین است. تفاوت تک نوکلئوتیدی و تغییر نوکلئوتید گوانین به سیتوزین در موقعیت بازی ۷۹۸ در توالی ژن *fliC* فلاژلین بین بورخولدریا مالئی و بورخولدریا پسودومالئی علیرغم غیر متحرک بودن بورخولدریا مالئی، از فاکتورهای مهم افتراق دو گونه‌ی باکتری است (۱۷). با این وجود، اسپارگ وهمکاران نشان دادند که این موتاسیون در بورخولدریا مالئی اختصاصی نبوده و در برخی از سویه-های بورخولدریا پسودومالئی نیز دیده می‌شود (۱۴). تشخیص بورخولدریا مالئی بازپدید در طغیان اخیر مشمشه در امارات متحده عربی توسط شولز و همکاران با تکثیر و مطالعه‌ی لوکوس ژنی IS407-flip انجام گرفت و به عنوان ابزار تشخیصی حساس، ساده و سریع برای تشخیص اختصاصی این باکتری در نمونه‌های بالینی به‌کار رفت (۱۲). ژن *BimA* بورخولدریا مالئی کد کننده‌ی پروتئین مورد نیاز برای حرکت اکتینی درون‌سلولی ارگانیسم جهت فرار از پاسخ‌های ایمنی میزبان است. علیرغم تفاوت در توالی نوکلئوتیدی ژن *BimA* بورخولدریا مالئی و بورخولدریا پسودومالئی، بورخولدریا مالئی پروتئین *BimA* عملکردی را کد می‌کند. با توجه به تفاوت نوکلئوتیدی ژن *BimA* این دو گونه‌ی باکتری به ویژه در بخش '۵ و انتهای آمینی، این ژن مارکر تشخیصی مهم برای افتراق دو گونه است (۱۷). اولریچ و همکاران از ماکر *BimA* برای شناسایی اختصاصی بورخولدریا مالئی و افتراق آن از بورخولدریا پسودومالئی استفاده کردند (۱۷). با تکمیل تعیین توالی کل ژنوم بورخولدریا مالئی و بورخولدریا پسودومالئی توسط موسسه سانگر (Sanger Institute, http://www.sanger.ac.uk/) و موسسه تحقیقات ژنومی (Institute of Genome Research, http://www.tigr.org/) و مشخص شدن تفاوت‌های ژنوم این دو گونه می‌توان برای طراحی لوکوس‌های اختصاصی و بهینه‌سازی روش‌های تشخیصی-تفریقی استفاده کرد.

نتیجه‌گیری کلی

گزارش مشمشه در کشور حتی بصورت تک‌گیر، هشداری برای نهادهای بهداشتی و مراقبتی است. با توجه به مشکلات تشخیص سریع و دقیق عامل عفونی مشمشه، شناسایی ارگانیسم در این مطالعه با استفاده از ژن‌های اختصاصی IS*407*، IS*407-flip* و 23S rRNA مطابق با استانداردهای تشخیصی سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) با حساسیت و اختصاصیت بالا صورت گرفت.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری تخصصی میکروبیولوژی نویسنده اول است که با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام گرفت. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بعمل می‌آورند. از دکتر محمد اسلام‌پناه در بخش آسیب‌شناسی موسسه رازی در تهیه تصاویر میکروسکوپی و مطالعات پاتوبیولوژیکی قدردانی می‌گردد. همچنین از سازمان دامپزشکی استان آذربایجان غربی و کوشش‌های دکتر خیری کمال تشکر را دارم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

1. Baharsefat, M. and A. Amjadi. 1970. Equine Melioidosis in Iran. *Archives of Razi Institute* 22: 209–213. (In Farsi).

2. Bauernfeind, A., C. Roller, D. Meyer, R. Jungwirth and I. Schneider. 1998. Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2737–2741.

3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory-acquired human glanders--Maryland. 2000. The Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 49: 532–535.

4. Gee, J. E., C. T. Sacchi, M. B. Glass, B. K. De, R. S. Weyant, P. N. Levett and et al. 2003. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 4647–4654.

5.Khaki, P., N. Mosavari, N. S. Khajeh, M. Emam, M. Ahouran, S. Hashemi and et al. 2012. Glanders outbreak at Tehran Zoo, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 4:3–7.

6.Khan, I., L. H. Wieler, F. Melzer, M. C. Elschner, G. Muhammad, S. Ali and et al. 2013. Glanders in Animals: A Review on Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases* 60: 204–221.

7.Lopez, J., J. Copps, C. Wilhelmsen, R. Moore, J. Kubay, M. St-Jacques and et al. 2003. Characterization of experimental equine glanders. *Microbes and Infection* 5: 1125–1131.

8.Malik, P., H. Singha, S. K. Goyal, S. K. Khurana, B. N. Tripathi, A. Dutt and et al. 2015. Incidence of *Burkholderia mallei* infection among indigenous equines in India. *Veterinary Record Open* 2: e000129.

9.Mardani, M. and M. Kamali. 2011. Review of glanders disease threat again. *Journal of Shahid Beheshti University of Medical Sciences* 35: 174–181. (In Farsi).

10.Pourtaghva, M., A. Dodin, M. Portovi, M. Tehrani and M. Galimand. 1977. First case of human pulmonary Melioidosis in Iran. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 70: 107–109.

11.Riedel, S. 2004. Biological warfare and bioterrorism: a historical review. Baylor University Medical Center Proceedings 17: 400–406.

12.Scholz, H. C., M. Joseph, H. Tomaso, S. Al Dahouk, A. Witte, J. Kinne and et al. 2006. Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54: 241–247.

13.Smith, M. E. and W. G. Gossman. 2018. Glanders And Melioidosis. *StatPearls* 65: e32-e39.

14.Sprague, L. D, G. Zysk, R. M. Hagen, H. Meyer, J. Ellis, N. Anuntagool and et al. 2002. A possible pitfall in the identification of *Burkholderia mallei* using molecular identification systems based on the sequence of the flagellin fliC gene. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34: 231–236.

15.Tadjbakhsh, H. 1994. Traditional methods used for controlling animal diseases in Iran. *Revue Scientifique et Technique* 13: 599–614.

16.Thibault, F. M., E. Hernandez, D. R. Vidal, M. Girardet and J. D. Cavallo. 2004. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 1134–1138.

17.Ulrich, R. L., M. P. Ulrich, M. A. Schell, H. S. Kim and D. DeShazer. 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.

18.Van Zandt, K. E., M. T. Greer and H. Gelhaus. 2013. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8: 131.

19.World Organization for Animal Health (OIE). 2013. Glanders, Chapter 2. 5. 11. Paris, France: OIE Terrestrial Manual, OIE. www.oie.int.

www.SID.ir