Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۵۵-۴۵

استفاده از آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای با پیکره *بورخولدریا مالئی* برای تشخیص بیماری مشمشه در ایران

سعید محمد حسینی [۱]، نادر مصوری [۲]*، لیدا عبدالمحمدی خیاو [۳]

۱. کارشناس ارشد بخش رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماریزای دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات و ترویج کشاورزی (تات) ، تهران، ایران

۲. دانشیار بخش رفرانس 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 مهم‌ترین بیماری های قابل انتقال از حیوانات تک سمی بوده که عامل آن *بورخولدریا 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 حضور آنتی‌بادی بود. برای این منظور ۴۰ نمونه سرم اسب از استان‌های مختلف اخذ و به همراه نمونه آنتی‌ژن پیکره باکتری *بورخولدریا 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 لکه‌گذاری نقطه‌ای، آنتی ژن روی چاهک کاغذ نیتروسلولز 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 نهایتا 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 مالئیناسیون به عنوان آزمون استاندارد و مقایسه آن با لکه‌گذاری نقطه‌ای به ترتیب حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ و ۹۱/۹٪ شد. نتایج نشان داد روش لکه‌گذاری نقطه‌ای به دلیل حساسیت بالا، سرعت، سهولت قرائت و قابلیت کاربردی صحرایی آن، در صورت تایید مراجع مسئول تشخیص در عفونت با *بورخولدریا مالئی* می‌تواند استفاده شود.

واژه های کلیدی: *بورخولدریا مالئی*، مشمشه، لکه‌گذاری نقطه‌ای، تشخیص.

نویسنده مسئول: نادر مصوری

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماریزای دام. البرز، کرج تلفن: ۳۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶

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 سال های 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 کانون های 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 سال های 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 آئروسل و عدم وجود واکسن و درمان موثر، از سال ۱۹۱۵ میلادی در لیست سلاح‌های بیولوژیک و لیست باکتری‌های پاتوژن CDC و OIE قرار گرفت (۱۹،۷). 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 اسب سانان غیر مجاز، تهدیدی برای ورود بیماری در ایران به شمار می روند. در بررسی برومند فر و همکاران در مرز بین استان آذربایجان غربی و کردستان عراق تک سمیان آلوده توسط تکنیک‌های مالئیناسیون و الایزا شناسایی و معدوم شدند (۵و۴).

در حال حاضر تشخیص مشمشه به روش مالیئناسیون و CF می‌باشد (۱۴). آزمایش مالیئناسیون 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 ۱۳۹۶تعداد 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 سانتریفیوژ 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 الایزا و CF که به صورت روتین در آزمایشگاه رفرانس توبرکولین انجام می‌شود، از نظر تیتر آنتی بادی تایید شدند (بدون تیتر 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 تیتر آنتی بادی).

تهیه نمونه سرم کنترل مثبت

از سویه تولیدی *بورخولدریا مالئی* سوسپانسیونی با سرم فیزیولوژی تهیه و در محیط نوترینت گلیسیرینه کشت داده شد. پس از رشد، سوسپانسیونی از باکتری معادل رقت لوله یک مک فارلن تهیه و یک میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی به خوکچه 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 تائید، 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 تائید نهایی استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. پس از تائید سوسپانسیونی از باکتری تهیه و به صورت داخل صفاقی به خوکچه هندی تزریق شد. ادامه مشابه مراحل قبل تکرار شد تا آنتی ژن سه بار حاد تهیه گردید. جهت تائید *بورخولدریا مالئی* از این نمونه DNA استخراج و آزمون PCR توسط پرایمرهای فوق‌الذکر انجام گرفت.

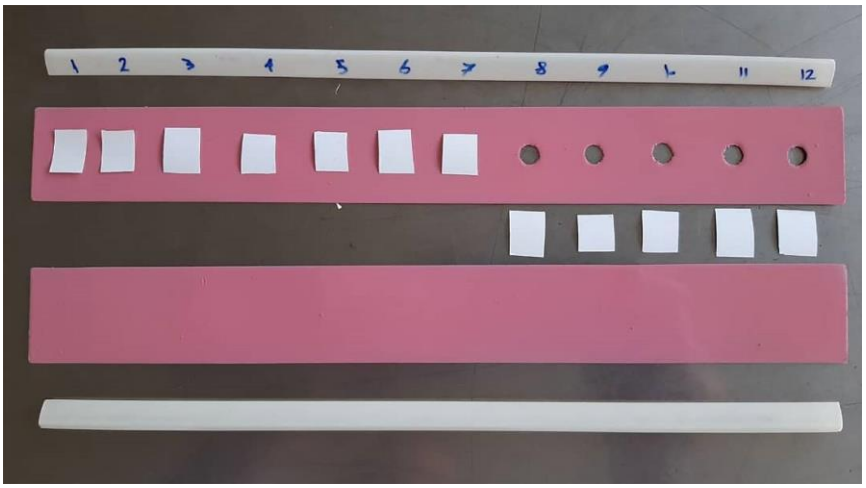
جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در تعیین هویت مولکولی سویه مرجع *بورخولدریا مالئی*

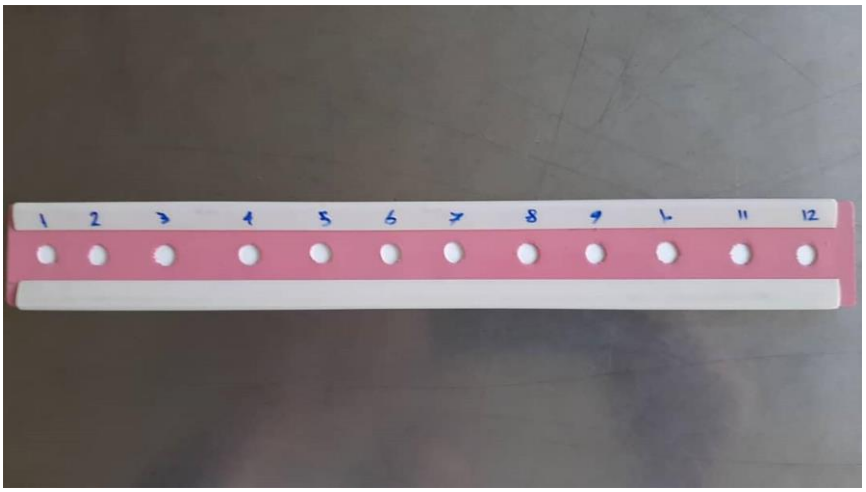
پرایمر	ژن	توالی پرایمرها (´3-´5)	منبع
Bma-IS407-flip-f	flip	5-TCAGGTTTGTATGTCGCTCGG-3	(18)
Bma-IS407-flip-r	flip	5-CTAGGTGAAGCTCTGCGCGAG-3	(18)
BimA	BimA	5-TTCGATCGATTCCTGCTATC-3	(18)
BimA	BimA	5-GCGTTAAACGCCGTACTTTC-3	(18)

به دو راس اسب دو میلی لیتر 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 تیتر آنتی بادی گردید. از این سرم‌ها به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

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 ۰/۵سانتی‌متر در ۰/۵ سانتی‌متر به تعداد چاهک ها برش داده سپس هر کدام از برش‌های ممبرن بر روی چاهک ها قرار گرفته و صفحه زیرین کاست بر روی آن قرارگرفت و دو صفحه به وسیله گیره به یکدیگر متصل شدند. (تصویر ۱و۲)





تصویر ۱و۲- کاست تهیه شده برای آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای

آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای

رقت مناسب آنتی‌بادی سرم و آنتی‌ژن با روش تیتراسیون چکر بورد با استفاده از نمونه‌های سرم کنترل مثبت و منفی تعیین گردید. اپتیمم رقت آنتی ژن (حدود ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر پیکره باکتری) بر روی کاغذ نیتروسلولز (Nagel-Macherey Germany) کوت گردید. کاست در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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-تویین (pH :7.2) روی چاهک ها ریخته وبه مدت سه ساعت داخل سردخانه قرار گرفت. پس از گذشت سه ساعت مجددا 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 چاهک‌ها نمونه تست‌ها 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).

(Amersham BioSciences, UK) رقیق شده توسط بافر فسفات توئین (رقت ۱/۵۰) اضافه و مجددا به مدت ۳۰ دقیقه در سردخانه انکوبه شد. پس از این زمان چاهک‌ها با PBS توئین‌دار شسته و در نهایت سوبسترای ۳و'۳و۵و'۵-تترا متیل بنزیدین به چاهک‌ها اضافه گردید. هر چاهک که آنتی‌بادی مورد نظر در آن وجود داشت مثبت و به رنگ آبی مشاهده شد و اگر در چاهکی تغییر رنگ صورت نمی گردید منفی قلمداد شد.

آزمون مالئیناسیون

۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مالئین داخل پلک پایین دام مورد نظر تزریق گردید و پس از ۴۸ ساعت نتیجه آزمایش قرائت و تفسیر نتایج صورت گرفت. در صورت عدم مشاهده هرگونه واکنش، نتیجه منفی گزارش شد. چنانچه تورم همراه با پرخونی در مخاط چشم مشاهده گردد، حیوان مشکوک و در صورت وجود علائم فوق همراه با ریزش ترشحات غلیظ و زرد رنگ از بینی و چشم حیوان بیمار، تلقی گردید.

تعیین حساسیت و ویژگی :

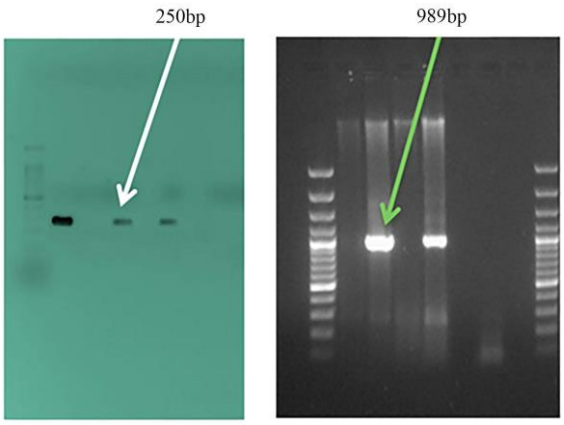
نتایج تمام نمونه‌های سرم در جدول اکسل جمع آوری شده و پس از تعیین موارد مثبت و منفی واقعی و کاذب توسط نرم افزار آماری SPSS ۱۶ آزمون زیر مجموعه کای اسکوار (آزمون مک نمار)، حساسیت و ویژگی هر آزمون با استفاده از معیار واکنش دهنده‌های مثبت و منفی واقعی ارزیابی شد.

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{موارد مثبت واقعی}}{\text{موارد منفی کاذب+موارد مثبت واقعی}} =$$

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{موارد منفی واقعی}}{\text{موارد منفی واقعی + موارد مثبت کاذب}} =$$

نتایج

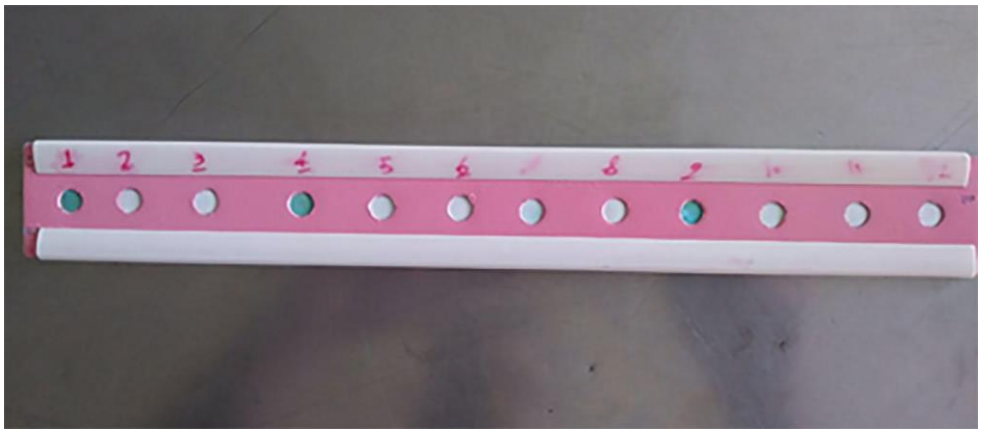
نتایج آزمون های بیوشمیایی وجود *بورخولدریا مالئی* را برای سویه تولیدی اثبات نمود. همچنین نتایج آزمون های مولکولی نیز تولید قطعه ۲۵۰ و ۹۸۹ زوج باز در آزمون PCR توسط پرایمر Bim A و Flip ماهیت باکتری مورد استفاده در پژوهش را تایید نمود. تصویر ۳ آزمون تعیین هویت لوکوس Flipو Bim A را نشان می‌دهد.



تصویر ۳- آزمون تعیین هویت لوکوس Flip و Bim A

تصویر سمت راست: چاهک ۱ لدر، چاهک ۲ *بورخولدریا سودو مالئی* (کنترل منفی)، چاهک ۳ سویه تولیدی *بورخولدریا مالئی* سه بار حاد، ، چاهک ۴ کنترل منفی (بدون DNA ژنومی)، چاهک ۵ سویه *بورخولدریا مالئی* در محیط کشت ژلوز گلیسرینه ، چاهک ۶ خالی

در این بررسی از ۴۰ نمونه، شش مورد مثبت مشمشه در استان‌های اصفهان، بوشهر، فارس و گلستان شناسایی گردید. تصویر ۴ نتایج لکه‌گذاری نقطه‌ای یکی از کاست‌ها را نشان می‌دهد.



تصویر ٤- لکه‌گذاری نقطه‌ای 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.

جدول ۲: نتایج آزمون‌های لکه‌گذاری نقطه‌ای و مالئیناسیون در نمونه‌های سرم از اسب‌داری‌های استان‌های مختلف ایران

شماره نمونه	استان	مالئیناسیون	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 مالئیناسیون و لکه‌گذاری نقطه‌ای

	لکه گذاری نقطه ای		
	-		+
تست مالئیناسیون	-	۳۴ منفی واقعی	۳ مثبت کاذب
	+	۰ منفی کاذب	۳ مثبت واقعی

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

جدول ٤- نتایج آنالیز آماری زیر مجموعه کای اسکوار (مک نمار) برای آزمون های مالئیناسیون 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 ٥- نتایج آنالیز آماری مک نمار برای آزمون‌های مالئیناسیون و لکه‌گذاری نقطه‌ای

Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.250[a]
N of Valid Cases	40	
a. Binomial distribution used.		

با در نظر گرفتن مالئیناسیون 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

بورخولدریا مالئی عامل بیماری مشمشه بوده که در سال‌های اخیر به دلیل گسترش گروه‌های تندروی مذهبی در منطقه خاورمیانه اخیر و هچنین گزارش اپیدمی‌ها در نواحی خاصی از کشور به عنوان مثال فارس و کردستان و همچنین با توجه به انتقال مشمشه 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 می‌باشدکه با توجه به خطرات آن در حال

حاضر تشخیص مشمشه به روش مالیئناسیون انجام می‌شود که نیاز به ۴۸ ساعت زمان دارد.

با توجه به اینکه شهرهای مرزی توان نگه‌داری 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. درغیر این صورت باعث آسیب به اسب می‌شود.

ورما و همکاران لکه‌گذاری نقطه‌ای را با استفاده از آنتی‌ژن‌های *بورخولدریا* برای تشخیص مشمشه 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 هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و کانترایمونو الکتروفورزیز مقایسه شد. نتایج نشان داد، لکه گذاری 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 آنتی بادی را نسبت به آزمون‌های دیگر مشخص می‌نماید (۲۰و۲۱) از سویی تیتر لکه‌گذاری نقطه‌ای برای زمان طولانی‌تری مثبت باقی می‌ماند (حتی در یازدهمین هفته) در حالی که تیتر فیکساسیون کمپلمان و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و مخصوصا کانترایمونو الکتروفورزیز 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 نقطه‌ای، در حیواناتی که تحت آزمون مالئیناسیون قرار می‌گیرند ممکن است تا ۶ هفته آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای مثبت شود. از مزایای دیگر این آزمون، تیتر بالای 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 هماگلوتیناسیون 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 مشمشه استفاده نمود. نتایج این بررسی نشان داد حساسیت تست لکه‌گذاری نقطه‌ای با آنتی ژنهای ثبوت عناصر مکمل ۱۰۰ درصد، با آنتی‌ژن

نوترکیب ۹۰/۹۱ درصد و با پروتئین خالص شدهٔ 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 می نماید 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 توبرکولین و مالئین که در این تحقیق همکاری نمودند کمال تشکر و سپاس‌گذاری را داریم.

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- Firouzbakhsh, 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 piroplasmosis 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.

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.
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., Amornpunt, 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.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

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

Saeed Mohammad Hoseini[1], Nader Mosavari*[2], Lida Abdolmohammadi khiav[3]

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