نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۲۲-۱۱

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

شناسایی آزمایشگاهی جدیدترین جدایه‌های جمع‌آوری شده *بورکولدریا مالیای* از عفونت های تک‌سمیان، روزآمد سازی اطلاعات موجود در ایران

شجاعت دشتی پور[۱] ، نادر مصوری[۲] ، نفیسه شکیبامهر[۱] ، مهدی بابایی[۱] ، سامرند رشادی[۱] ، کیوان تدین[۳] ، روح اله کشاورز[٤*]

۱- کارشناس آزمایشگاه، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

۲- دانشیار میکروبیولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

۳- دانشیار میکروبیولوژی، بخش واکسن های باکتریایی هوازی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

۴- استادیار بیوتکنولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱

چکیده

خاورمیانه، که به عنوان خواستگاه اهلی سازی حیوانات شناخته می‌شود، از معدود مناطق جغرافیایی باقی‌مانده در جهان است که هم چنان موارد بروز مشمشه در میان تک سمیان و برخی مواقع انسان از آنها گزارش می‌شود. در این شرایط، در ایران با برخورداری از سابقه بیش از ۶ دهه اجرای آزمون مالئیناسیون گله‌های اسب، قاطر و الاغ، هر چند وقت یک بار موارد کوچک و متوسط وقوع بیماری به ویژه در مناطق غربی و مرکزی کشور مشاهده می‌شوند. مطالعه حاضر به منظور شناسایی ویژگی‌ها و خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی جدیدترین جدایه‌های جمع آوری شده *بورکولدریا مالیای* در ایران اجرا گردیده است. کشت باکتریایی، تست‌های بیوشیمیایی، تست ثبوت عناصر مکمل و وسترن بلات، آزمون های Bim A-PCR و Flip 407-PCR و همچنین آزمون اشتراوس در برنامه آزمایشات این تحقیق قرار گرفتند. یافته‌های بدست آمده در آزمایشات، ویژگی‌های مورد انتظار شناخته شده باکتری را در مورد هر چهار جدایه جمع‌آوری شده از موارد وقوع بیماری در تهران، کردان، اشنویه و سمیرم نشان دادند. اینکه جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق نماینده جمعیت/جمعیت هایی محلی یا منطقه ای از *بورکولدریا مالیای* هستند، انجام مطالعات بیشتر مورد نیاز خواهد بود.

کلمات کلیدی: مشمشه، تک‌سمیان، ایران

*نویسنده مسئول: روح اله کشاورز

آدرس: آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

پست الکترونیک: piroozkeshavarz@gmail.com

مقدمه

به دلیل ملاحظات بهداشتی-امنیتی مشمشه به عنوان یک بیماری مشترک و بر اساس مقررات سازمان جهانی بهداشت دام، تمام کشورهای عضو مکلف به گزارش همه موارد وقوع مشمشه خود به این سازمان هستند. سابقه شناسایی مشمشه در تک سمیان به دوران ارسطو در ۳۵۰ سال پیش از میلاد مسیح باز می گردد و قدیمترین گزارش تایید شده از ابتلاء انسان به سال ۱۷۹۳ باز می‌گردد که بر اساس آن Charles Vial de St Be نخستین پروفسور منصوب در کالج تازه تاسیس شده دامپزشکی در لندن در نتیجه ابتلا به بیماری درگذشت. موارد انسانی مشمشه در طبیعت نادر هستند، اما وقوع آن در میان دامپزشکان، کارکنان آزمایشگاه‌های تشخیصی و کشتارگاه‌ها و افرادی نظیر مربیان اسب که با تک‌سمیان از نزدیک در تماس قرار دارند بیشتر از بقیه می‌باشد (۱).

با وقوع مکرر جنگ و ناآرامی و به دنبال آن فقر فراگیر در بسیاری از مناطق خاورمیانه و از جمله افغانستان، یمن، عراق و سوریه، زمینه ظهور و طغیان مجدد بیماری در کشورهای منطقه فراهم شده است، به طوری که در ۱۵ سال اخیر تعداد گزارشات وقوع مشمشه روند فزاینده داشته (۱) و در بحرین (۲)، کویت (۳)، امارات متحده عربی (۴)، ایران (۵)، عراق (۶)، پاکستان و ترکیه (۷) گزارش گردیده است. بدلیل نگرانی های بهداشتی و مقررات قانونی کشت باکتریایی و نگهداری جدایه های زنده *بورکولدریا مالیای* توسط آزمایشگاه های تشخیصی انسانی و دامپزشکی آزمایشگاههای با محدودیت مواجه و منحصر به مراکزی نظیر تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج می باشد. با افزایش موارد همه گیری مشمشه در ایران تعداد جدایه‌های جمع آوری شده از موارد بالینی دامی در نتیجه نمونه برداری و کشت باکتریایی موفق در موسسه رازی نیز رو به ازدیاد گذاشته است. در مطالعه حاضر ویژگی‌ها و خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی چهار جدایه *بورکولدریا مالیای* اخذ شده از تک‌سمیان بومی ایران مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد مطالعه

طی سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۶ در جریان بررسی‌های میدانی چهار مورد جداگانه وقوع بیماری در یک مورد ببر باغ وحش تهران (۱۳۸۹)، و ۳ مورد اسب به ترتیب در کردان در استان البرز (۱۳۹۱)، اشنویه در استان آذربایجان غربی (۱۳۹۳) و سمیرم در استان اصفهان (۱۳۹۶) گزارش و نسبت به معدوم سازی و نمونه برداری دام‌های بیمار و بر حسب مورد اخذ نمونه خون و سواپ از چشم، منخرین و همچنین زخم‌های جلدی دام ها اقدام گردید. با انتقال نمونه‌ها به موسسه رازی اقدامات لازم برای کشت میکروبی آنها با استفاده از کیت API20 (bioMérieux, Inc, USA) و بررسی PCR با استفاده از دو مارکر ژنتیکی Bim A و-Flip IS407 انجام گرفت و در نتیجه چهار جدایه *بورکولدریا* جمع‌آوری گردید. در اجرای تحقیق حاضر از این چهار جدایه استفاده شد. در تابستان ۱۳۹۹ هر چهار جدایه از آرشیو نگهداری شده در دمای ۷۰- °C اخذ و در BioSafety Cabinet Class II با استفاده از کشت در محیط نوترینت حاوی ۱٪ گلیسرین و به دنبال آن گرم‌خانه گذاری ۴۸ ساعته در دمای ۳۷ °C بازیافت شدند.

آزمایشات بیوشیمیایی

از کلنی‌های انفرادی باکتری رشد یافته بر روی محیط نوترینت حاوی ۱٪ گلیسرین در اجرای آزمایشات افتراقی حرکت، تخمیر قندها و تولید گاز و با استفاده از

کیت API20 (bioMérieux, Inc, USA) آزمون‌های ایندول، سیمون سیترات و اوره مورد بررسی قرار گرفتند (۲). سویه آزمایشگاهی *بورکولدریا مالیای* RTCC: 2375 که از آن برای تهیه و تولید مالئین در ایران استفاده می‌شود به عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد.

آزمایشات مولکولی

برای استخراج ژنوم، معادل یک لوپ از توده رشد باکتری بر روی محیط کشت نوترینت حاوی ۱٪ گلیسرین برداشت شد و به ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE -1X موجود در یک میکروفیوژ تیوب دارای واشر ایمنی ضد نشت انتقال یافت. سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در عمق یک بن ماری محتوی آب در حال جوش مستقر و غیر فعال گردید. از این سوسپانسیون به صورت مستقیم در انجام آزمون‌های مولکولی استفاده گردید (8). برای انجام آزمایش PCR از دو مارکر ژنتیکی Bim A و Flip-IS*407* استفاده شد. حجم نهایی هر واکنش PCR در هر دو آزمون که به صورت مستقل اجرا گردیدند بر روی ۱۶ میکرولیتر تنظیم گردید، به طوری که هر واکنش شامل ۸ میکرولیتر Master mix (Ampliqon, Denmark)، یک میکرولیتر از (محلول ۵ پیکومول در هر میکرولیتر) هر یک از زوج پرایمرهای Bim A و Flip-IS*407* شامل (5'-TCA GGT TTG TAT GTC GCT CGG-3') به عنوان Bma-IS*407*-flip-f و (5-TAG GTG AAG CTC TGC GCG AG-3) به عنوان Bma-IS*407*-flip-r معرفی شده توسط (۹, ۱۰) و یا (5-TTC GAT CGA TTC CTG CTA TC-3) به عنوان AT5 و (5-GCG TTA AAC GCC GTA CTT TC-3) به عنوان AT4 معرفی شده توسط Ulrich و همکاران (۱۱)، مقدار ۱/۵ میکرولیتر سوسپانسیون ژنوم باکتری همراه با ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر گردید. از آب مقطر دوبار تقطیر و ژنوم سویه *بورکولدریا مالیای* RTCC 2375 به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. فرایند حرارتی به منظور استفاده در تکثیر با استفاده از ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) شامل ۵ دقیقه گرمایش اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۴ چرخه شامل ۳۰ ثانیه گرمایش در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه گرمایش در ۶۵ درجه سانتی‌گراد (Bma-IS407-flip) یا ۵۶ درجه سانتی‌گراد (Bim A) برای الحاق پرایمرها به سایت هدف بر روی ژنوم باکتری، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای اجرای تکثیر و در انتها ۲۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکمیل فرآیند تکثیر گردید. از آگاروز یک درصد (Roche, Germany) MP پیش رنگ شده با (iNtRON Biotecnology, South Korea) Red Safe® همراه با مارکر ژنتیکی با اندازه ۱۰۰ زوج باز برای الکتروفورز (۱ ساعت در 4 V/Cm) و سپس ترانس لومیناتور برای ظهور و تصویر برداری از محصولات PCR استفاده شد.

آزمایشات سرمی

CF و وسترن بلات

با استفاده از نمونه‌های سرم خون، آزمون‌های CF و وسترن بلات انجام گرفت. برای کنترل مثبت و منفی به ترتیب از سرم اسب شارژ شده با سویه *بورکولدریا مالیای* RTCC: 2375 و سرم منفی استاندارد موجود در آزمایشگاه استفاده گردید.

آزمون CF، به طور خلاصه، از همولایزین و کمپلمان (موسسه رازی، کرج)، به ترتیب رقت‌های ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰ تهیه و پس از تیتراسیون، مناسب‌ترین رقت از آنها برای انجام آزمایش CF آماده سازی گردید. به این ترتیب با استفاده از بافر ورونال ($CaCl_2.2H_2O$، ۱/۲۵۶ میلی مولار؛ $MgCl_2.2H_2O$، ۴/۱۳۲ میلی مولار؛ NaCl،

۷۲۷/۲ میلی مولار؛ $C_8H_{12}N_2O_3$، ۱۵/۸۵ میلی مولار؛ $C_8H_{11}N_2O_3Na$، ۹/۰۷ میلی‌مولار) و خون دفیبرینه تازه گوسفندی (۲٪) و تیتر مناسب از همولایزین خرگوش، سیستم همولیتک آماده گردید. برای آماده سازی، نمونه سرم‌های مورد آزمون، کنترل مثبت و کنترل منفی در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و با استفاده از بافر ورونال، ۵ برابر رقیق گردیدند. به این ترتیب در چاهک های ردیف‌های B، C، D و E یک پلیت ۹۶ خانه U شکل، مقدار ۲۵ میکرو لیتر از بافر ورونال ریخته و ۵۰ میکرولیتر از سرم‌های رقیق شده (یک به پنج رقیق شده در بافر ورونال) در ردیف A (از خانه شماره ۱ تا ۶) اضافه گردید. ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم های رقیق شده ردیف A برداشته (رقت ۱:۱۰) به ردیف B اضافه شد و به همین ترتیب در مورد تمام ردیف‌های C، D و E نیز انجام گردید و در نهایت ۲۵ میکرولیتر آخر دور ریخته شد. مقدار ۲۵ میکرولیتر از غلظت مناسب آنتی ژن (BioVeta, Czech Republic) به تمامی خانه‌های ردیف A تا E اضافه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر از کمپلمان تیتر شده به تمام خانه‌های ردیف A تا E اضافه و پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و در نهایت ۵۰ میکرولیتر از سیستم همولیتیک به تمام چاهک‌ها اضافه و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت پلیت به مدت ۳ دقیقه در ۳۶۰ g سانتریفیوژ و به صورت چشمی تحت نور کافی توسط اپراتور مورد بررسی دقیق قرار گرفت (۱۲-۱۴).

آزمایش‌های SDS-Page و وسترن بلات: به طور خلاصه، مقدار ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون پروتئینی *بورکولدریا مالیای* سویه RTCC ۲۳۷۵ بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ بارگزاری و الکتروفورز گردید (۵ V/cm، ۱۲۰ دقیقه). در مرحله بعد از کوماسی بلو برای رنگ آمیزی ژل و آشکارسازی باندهای پروتئینی استفاده شد(۱۵) . به همین روش ژل دوم پلی آکریل‌آمید نیز تهیه و از آن برای اجرای آزمون وسترن بلات استفاده گردید(۱۴, ۱۶) . از ژل دوم، جهت انتقال پروتئین به غشاء PVDF (Roche, Germany) استفاده گردید و با استفاده از کاغذهای جاذب رطوبت، ساندویچ پنل تهیه و در کنار یخ در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد در میدان الکتریکی (۲۰ ولت/۱۶ ساعت) قرار داده شد تا انکوباسیون و عملیات انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشاء تکمیل گردد. پس از فرآیندهای تثبیت باندهای پروتئینی بر روی غشاء PVDF با استفاده از متانول، فرآیند بلاکینگ غشاء با استفاده از BSA با غلظت ۳٪ به مدت ۲ ساعت انجام گرفت. در ادامه با اضافه نمودن نمونه های سرم با رقت ۱:۵۰، انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۳ بار شستشو (هر مرحله ۵ دقیقه) با استفاده از بافر TBST (Tris، ۶/۰۵۷ گرم؛ NaCl، ۸/۷۶۶ گرم؛ Tween 20، ۲ میلی‌لیتر؛ pH:8 در یک لیتر آب مقطر) انجام شد و در ادامه به غشاء PVDF آنتی بادی کنژوگه Goat Anti horse IgG HRP conjugated اضافه گردید (رقت ۱:۵۰۰۰۰). مجددا ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۰ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام و متعاقباً پس از ۳ بار شستشو، سوبسترای 3, 3-diaminobenzidine (DAP) اضافه شد. نتایج پس از ۲-۴ دقیقه گرم‌خانه گذاری غشاء در تاریکی و شستشوی آن با آب مقطر مورد بررسی قرار گرفت(۱۴, ۱۷) .

آزمایش تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی

برای انجام این آزمایش دوازده سر خوکچه هندی نر نژاد آلبینو با وزن حدود ۳۵۰ گرم استفاده شد. از کشت تازه *بورکولدریا مالیای* سویه آزمایشگاهی RTCC ۲۳۷۵ و همچنین دیگر جدایه‌ها، سوسپانسیون

باکتریائی با کدورت معادل لوله شماره یک مک فارلند در محلول سرم فیزیولوژی تهیه گردید. خوکچه ها به داخل دستگاه ایزولاتور منتقل و در قالب شش گروه دوتایی به هریک از آنها یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری (گروه اول: سویه RTCC 2375، گروه دوم: جدایه ببر سیبری، گروه سوم: جدایه کردان، گروه چهارم: جدایه اشنویه، گروه پنجم: جدایه سمیرم و گروه ششم: کنترل منفی، فقط سرم فیزیولوژی) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. خوکچه ها پس از تزریق تحت مراقبت پیوسته قرار گرفتند و پس از ایجاد واکنش اشتراوس، خوکچه های مبتلا در شرایط استریل، کالبدگشائی و از بیضه‌ها، کبد، ریه و طحال آنها نمونه برداری شده اقدام به کشت باکتریایی با هدف بازیافت *بورکولدریا مالیای* گردید(18, 19) .

نتایج

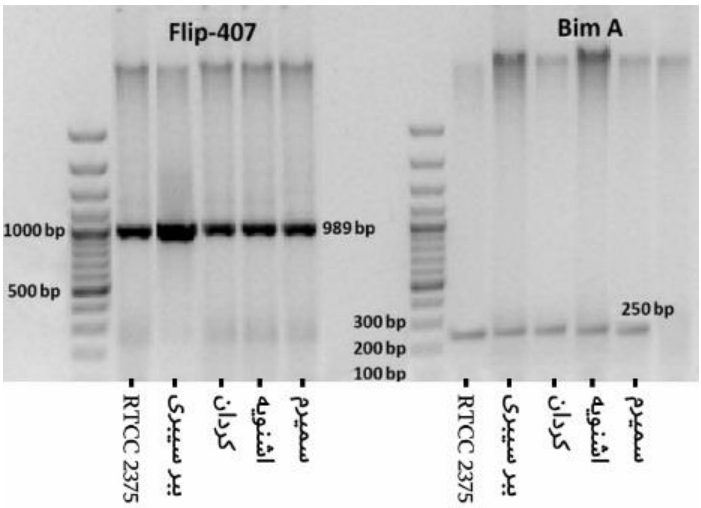
آزمایشات بیوشیمیایی

نتایج مشاهده شده از اجرای آزمایشات بیوشیمیایی در مورد هر چهار جدایه با تابلوی شناخته شده از ویژگی های کشت و بیوشیمیایی *بورکولدریا مالیای* (فقدان حرکت، SIM منفی، Simmons Citrate منفی، عدم تخمیر قند در TSI) منطبق بود (شکل۱) و بدین ترتیب هویت آنها به عنوان جدایه‌های این باکتری را تائید نمود.

شکل ۱: کشت و نتیجه آزمایشات بیوشیمیایی در مورد هر چهار جدایه

آزمایشات مولکولی

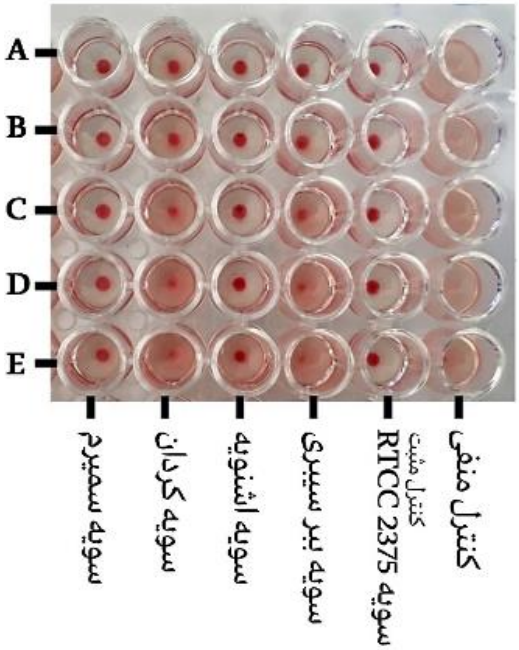
در آزمایشات Bim A-PCR و Flip-IS407-PCR تولید دو قطعه مورد انتظار به طول ۲۵۰ و ۹۸۹ زوج باز در مورد هر چهار جدایه مشاهده و بدین ترتیب هویت آنها به عنوان *بورکولدریا مالیای* تایید گردید (شکل ۲).



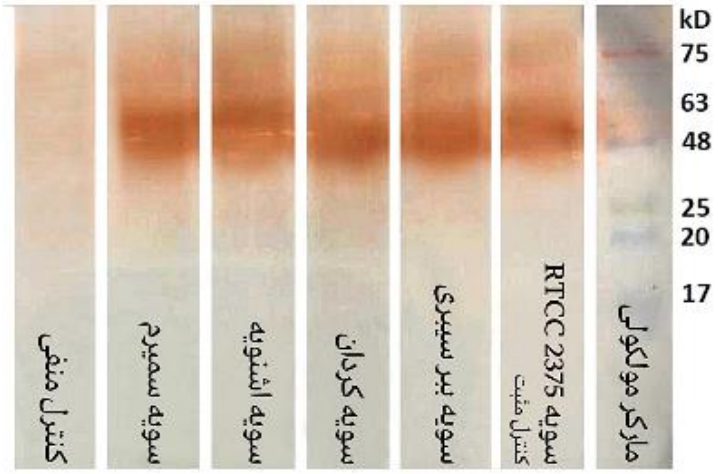
شکل ۲: تایید هویت جدایه‌ها به عنوان *بورکولدریا مالیای* با آزمایش Bim A-PCR و Flip-IS407-PCR

نتایج آزمون CF و وسترن بلات

در نتیجه اجرای آزمون CF، ضمن مشاهده رسوب کامل، نشانه‌ای از همولیز گلبول‌های قرمز در مورد هیچ کدام از چهار جدایه تحت آزمون و یا سویه کنترل RTCC 2375 مشاهده نگردید که نشانه مصرف کمپلمان و تاییدی بر حضور *بورکولدریا مالیای* بود (شکل ۳). علاوه بر این با مشاهده باندهایی در محدوده ۳۰ تا ۷۰ کیلودالتون بر روی غشاء PVDF در آزمون وسترن بلات، هویت هر چهار جدایه به عنوان *بورکولدریا مالیای* مورد تایید قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۳: آزمون CF برای جدایه‌های تحت مطالعه



شکل ٤: وسترن بلات جدایه‌های تحت مطالعه

واکنش اشتراوس

تزریق داخل صفاقی خوکچه‌های هندی نر با هر چهار جدایه و سویه RTCC 2375 منجر به بروز واکنش اشتراوس گردید که جداسازی باکتری از توده‌های بافتی متورم و چرک در همه موارد با موفقیت انجام گردید (شکل ۵).

شکل ۵: واکنش اشتراوس در خوکچه هندی. برای جزئیات به متن مراجعه نمایید.

بحث و نتیجه‌گیری

در نیم قرن اخیر همراه با رشد مدرنیزاسیون و توسعه شهرنشینی در ایران مشابه با دیگر کشورهای در حال توسعه، تعداد و پراکندگی گله‌های تک سمیان به تدریج محدودتر و کاربری آنها از کشاورزی، کوچ نشینی و دامپروری به ورزشی و توریسم پیوسته در حال تغییر بوده است. نقل و انتقال بین المللی اسب به منظور شرکت دادن آنها در مسابقات اسبدوانی و دیگر مسابقات ورزشی که با اسب انجام می گردند و بویژه جابجای هایی که بصورت قانونی و یا غیر قانونی در منطقه خاورمیانه صورت می پذیرند به عنوان مهمترین عامل رنسانس مشمشه در جهان معرفی شده اند (۲۰). در همین حال تقریباً در همه موارد گزارش شده مشمشه در ایران نقل و انتقال غیر مجاز تک سمیان و یا مصرف

گوشت آنها به عنوان غذای دام منبع اولیه ورود و انتشار عامل بیماری در جمعیت میزبان حساس شناخته شده است (۲۱) به نظر می‌رسد تک سمیان مورد استفاده در عملیات قاچاق در مرزهای غرب و شمال غرب ایران در کنار مشکلات لجستیکی در نظارت بر نقل و انتقال اسب و دیگر تک سمیان (۲۲) به عنوان کوریدور برون زاد مهم در نفوذ بیماری به جمعیت‌های تک سمی داخل کشور عمل می نمایند (۲۳). پیش از این نقش مناقشات نظامی منطقه ای و از جمله جنگ تحمیلی عراق علیه ایران در ایجاد اختلال در حوزه مدیریت بیماری های مشترک قابل انتقال به انسان مورد توجه قرار گرفته است (۲۴).

در حال حاضر برنامه مدیریت و کنترل مشمشه در تک سمیان ایران با اجرای برنامه تست و کشتار تک سمیان بر علیه مشمشه با اتکاء بر آزمون‌های مالئیناسیون داخل پلکی و نیز CF انجام می پذیرد. پیش از این نشان داده شده است که حتی نسخه فعلی آزمون CF مورد تایید OIE نیز می تواند در اجرا با موارد مثبت یا منفی کاذب همراه باشد (۱) که خود می تواند منجر به ایجاد خدشه در برنامه مدیریت و کنترل مشمشه گردد (۲۵). از طرف دیگر *بورکولدریا مالیای* پس از آلودگی میزبان قادر است سیستم ایمنی آنرا به کنترل خود درآورد و منجر به ایجاد آلودگی نهفته و بدون تظاهرات بالینی گردیده (۲۶) و در شناسایی و انهدام کانون‌های پایدار و موردی مشمشه در پهنه بزرگ ایران ایجاد اختلال نماید. حفظ امنیت زیستی کلنی‌های ارزشمند و گران قیمت اسبچه خزر در استان مازندران و دیگر گونه‌ها و نژادهای ارزشمند بومی اسب در ایران که پرورش آنها توسط اسب‌داران حرفه ای در مناطق دیگر ایران نظیر استان‌های یزد و فارس رو به توسعه می‌باشد، بر اهمیت اعمال دقیق‌تر و هوشمندانه برنامه کنترل و ریشه‌کنی بیماری و ارتقاء توانایی‌های آزمایشگاهی تشخیص بیماری می‌افزاید.

همراه با کاهش نقش اقتصادی و حضور تک سمیان در روستا و شهر و بدنبال آن کاهش موارد کلینیکی بیماری سطح آگاهی دامپزشکان از مشمشه، تظاهرات بالینی آن، اپیدمیولوژی و روش های تشخیصی آن رو به کاهش گذاشته است (24) ضمن آنکه ملاحظات اقتصادی و فرهنگی بومی نیز ممکن است موجبات مخالفت و مقاومت صاحبان تک سمیان آلوده به باکتری را که دارای تظاهرات بالینی نیستند بدنبال داشته باشد. نگرانی دامداران از اعمال محدودیت های قانونی پس از تشخیص مشمشه و راضی کننده نبودن میزان خسارت پرداخت شده از سوی دولت برای جبران ضرر ناشی از معدوم سازی حیوانات، می توانند موجبات عدم استقبال صاحبان دام از برنامه مدیریت و کنترل مشمشه و در نتیجه آنها تعمد در عدم گزارش موارد بیماری بگردد (۲۷) که همه این عوامل در شکست برنامه مدیریت و کنترل مشمشه و پایداری آن در گله های تک سمیان تاثیر خواهند گذاشت.

در سال ۲۰۲۰ در جریان انجام یک تحقیق در کویت جدایه های *بورکولدریا مالیای* از تعدادی اسب جدا گردیدند که در آزمون تشخیصی flip-IS*407*-PCR به عنوان یکی از مارکرهای اختصاصی و شناخته شده *بورکولدریا مالیای*، پاسخ منفی نشان دادند و بررسی های بیشتر این یافته را به عنوان ویژگی خاص این جدایه ها و احتمالا دیگر جدایه های بومی باکتری در کویت معرفی نمودند(28) . بدین نرتیب در اجرای بهینه برنامه مدیریت و کنترل مشمشه، شناسایی دقیق سویه‌های فعال بومی/غیر بومی درگردش، پراکنش جغرافیایی و ارتباطات ژنتیکی میان آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار خواهد بود. برای نیل به این اهداف جدا سازی باکتری،

اجتناب ناپذیر خواهد بود و بر همین اساس این مهم می‌باید به عنوان یک رکن در برنامه مدیریت و کنترل مشمشه مورد توجه قرار داشته باشد. انجام اقدامات درمانی دارویی و تجویز آنتی بیوتیک های وسیع الطیف برای دامهای مشکوک/بیمار قبل از انجام نمونه برداری و همچنین نوع و نحوه نگهداری نمونه های جمع آوری شده پیش از کشت آنها در آزمایشگاه با در نظر گرفتن قدرت زنده مانی محدود باکتری در خارج از بدن میزبان از جمله چالش های تکنیکی هستند که شانس موفقیت در جداسازی آزمایشگاهی این پاتوژن را کاهش می دهند. علاوه بر این رشد سریعتر باکتری های دیگری که معمولا همراه با *بورکولدریا مالیای* از نمونه جدا می گردند در صورت عدم اعمال تکنیک های مناسب و فقدان تجربه آزمایشگاهی کار با *بورکولدریا مالیای* می توانند مانع از دستیابی به جدایه خالص باکتری و از دست رفتن آن گردند. وجود همین محدودیت سبب شده است که علیرغم استقرار آزمایشگاه باکتری شناسی تخصصی در موسسه رازی تعداد جدایه های *بورکولدریا مالیای* ایرانی جمع آوری شده و موجود در آرشیو به کمتر از ۱۰ مورد محدود شود. جایگزینی سویه سوئدی IRBm325 که همکنون از آن در تولید صنعتی آنتی ژن مالئین در ایران استفاده می شود با سویه های ایرانی پس از جمع آوری جدایه های بیشتر باکتری از مناطق مختلف ایران و انجام مطالعات تکمیلی بیوشیمیایی و ژنتیکی امکان پذیر خواهد بود.

نویسندگان مقاله با معرفی بخشی از امکانات موجود در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در زمینه جداسازی و شناسایی *بورکولدریا مالیای* امیدوارند همراه با توسعه مراودات با آزمایشگاهای همکار و مشارکت در اجرای تحقیقات ژنتیکی بین المللی نظیر مطالعه ژنوم کامل این باکتری، امکان شناخت بهتر عامل بیماری و بهینه سازی روش‌های تشخیصی مشمشه در کشور فراهم گردد. این مطالعه نشان داد به دلیل اهمیت تشخیص سریع این آلودگی در کشور و مشکلات هر کدام از تکنیک ها، لازم است در خصوص طراحی و استفاده از تکنیک های ساده تر مانند الایزا که نیاز به امکانات خاص آزمایشگاهی ندارند، تلاش ویژه صورت پذیرد.

منابع

1. Ellis, P. (2020). Glanders: Re-emergence of an ancient zoonosis. *Microbiology Australia*, **41**: 41-44.
2. Wernery, U., Wernery, R., Joseph, M., Al-Salloom, F., Johnson, B., Kinne, J., Jose, S., Jose, S., Tappendorf, B.Hornstra, H. (2011). Natural *Burkholderia mallei* infection in dromedary, bahrain. *Emerging infectious diseases*, **17**: 1277-1279.
3. Laroucau, K., Aaziz, R., Vorimore, F., Varghese, K., Deshayes, T., Bertin, C., Delannoy, S., Sami, A.M., Al Batel, M.El Shorbagy, M. (2020). A genetic variant of *Burkholderia mallei* detected in kuwait: Consequences for the PCR diagnosis of glanders. *Transboundary and Emerging Diseases*, **68**: 960-963.
4. Wernery, U., Rodriguez Caveney, M., Wernery, R., Raghavan, R., Laroucau, K., Syriac, G., Thomas, S.M., John, J., Joseph, M. ,Jose, S., Joseph, S.Woo, P. (2019). Evaluation of serological responses in horses challenged with *Burkholderia pseudomallei* using current diagnostic tests for glanders. *Vetenaria Italiana*, **55**: 261-267.
5. Kianfar, N., Ghasemian, A., Al-Marzoqi, A.H., Eslami, M., Vardanjani, H.R., Mirforughi, S.A.Vardanjani, H.R. (2019). The reemergence of glanders as a zoonotic and occupational infection in Iran and neighboring countries. *Reviews in Medical Microbiology*, **30**: 191-196.

6. Hussein, Z.S. (2018). Detection of glanders in horses of eight Iraqi provinces by ELISA. *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences*, **11**: 21-25.
7. Sial, A.-U.-R., Saqib, M., Muhammad, G.Sajid, M.S. (2020). Seroprevalence and risk factors of equine glanders in selected districts of Khyber Pakhtunkhwa (kpk). *Pakistan Veterinary Journal*, **40**: 504-508
8. Merwyn, S., Kumar, S., Agarwal, G.Rai, G. (2010). Evaluation of PCR, DNA hybridization and immunomagnetic separation—pcr for detection of *Burkholderia mallei* in artificially inoculated environmental samples. *Indian Journal of Microbiology*, **50**: 172-178.
9. Scholz, H.C., Joseph, M., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Witte, A., Kinne, J., Hagen, R.M., Wernery, R., Wernery, U.Neubauer, H. (2006). *D*etection 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 Diseases*, **54**: 241-7.
10. Tomaso, H., Scholz, H.C., Al Dahouk, S., Eickhoff, M., Treu, T.M., Wernery, R., Wernery, U.Neubauer, H. (2006). Development of a 5'-nuclease real-time pcr assay targeting flip for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clinical Chemistry*, **52**: 307-10.
11. Ulrich, M.P., Norwood, D.A., Christensen, D.R.Ulrich, R.L. (۲۰۰۶). Using real-time pcr to specifically detect *Burkholderia mallei. Journal of medical microbiology*, **55**: 551-559.
12. Azizi, A., Ranjbar, B., Khajeh, K., Ghodselahi, T., Hoornam, S., Mobasheri, H.Ganjalikhany, M.R. (2011). Effects of trehalose and sorbitol on the activity and structure of *Pseudomonas cepacia* lipase: Spectroscopic insight. *International Journal of Biological Macromolecules*, **49**: 652-656.
13. Dallal, M.M., Telefian, C.F., Hajia, M., Kalantar, E., Dehkharghani, A.R., Forushani, A.R ,.Khanbabaei, Q., Mobarhan, M.Farzami, M.R. (2014). Identification and molecular epidemiology of nosocomial outbreaks due to *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients of masih daneshvary hospital, Iran. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, **55**: 27-30.
14. Elschner, M.C., Laroucau, K., Singha, H., Tripathi, B.N., Saqib, M., Gardner, I., Saini, S., Kumar, S., El-Adawy, H., Melzer, F., Khan, I., Malik, P., Sauter-Louis, C.Neubauer, H. (2019). Evaluation of the comparative accuracy of the complement fixation test, western blot and five enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of glanders. *PLoS One*, **14**: e0214963.
15. Babaie, M., Mehrabi, Z.Mollaei, A. (2020). Partial purification and characterization of antimicrobial effects from snake (*Echis carinatus*), scorpion (*Mesosobuthus epues*) and bee (*Apis mellifera*) venoms. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, **14**: 460-477.
16. Shakibamehr, N., Mosvari, N., Harzandi, N.Mojgani, N. (2021). Designing of western blot technique for glanders diagnosing in Iran .*Journal of Equine Veterinary Science*, 103403.
17. Elschner, M.C., Scholz, H.C., Melzer, F., Saqib, M., Marten, P., Rassbach, A., Dietzsch, M., Schmoock, G., de Assis Santana, V.L., de Souza, M.M., Wernery, R., Wernery, U.Neubauer, H. (2011). Use of a western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Veterinary Research*, **7**: 4.
18. Elschner, M., Klaus, C., Liebler-Tenorio, E., Schmoock, G., Wohlsein, P., Tinschmann, O., Lange, E., Kaden, V., Klopfleisch, R.Melzer, F. (2009). *Burkholderia mallei* infection in a

horse imported from brazil. *Equine Veterinary Education*, **21**: 147-150.
19. Eslampanah, M., Mosavari, N.Hablolvarid, M. (2015). *A* comparison of virulence of intraperitoneal infection of *Burkholderia mallei* strains in guinea-pigs. *Archives of Razi Institute*, **70**: 245-254.
20. Kettle, A.N. Wernery, U. (2016). Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. *Equine Veterinary Journal*, **48**: 654-658.
21. 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. *Iran Journal of Microbiology*, **4**: 3-7.
22. Dominguez, M., Münstermann, S., De Guindos, I.Timoney, P. (2016). Equine disease events resulting from international horse movements: Systematic review and lessons learned. *Equine Veterinary Journal*, **48**: 641-653.
23. Price, E.P., Seymour, M.L., Sarovich, D.S., Latham, J., Wolken, S.R., Mason, J., Vincent, G., Drees, K.P., Beckstrom-Sternberg, S.M.Phillippy, A.M. (2012). Molecular epidemiologic investigation of an anthrax outbreak among heroin users, europe. *Emerging infectious diseases*, **18**: 1307-1313.
24. Elschner, M.C., Neubauer, H.Sprague, L.D. (2017). The resurrection of glanders in a new epidemiological scenario: A beneficiary of "global change". *Current Clinical Microbiology Reports*, **4**: 54-60.
25. Khan, I., Wieler, L., Melzer, F., Elschner, M., Muhammad, G., Ali, S., Sprague, L., Neubauer, H.Saqib, M. (2013). *Glanders in animals:* A review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transboundary and emerging diseases*, **60**: 204-221.
26. Kettle, A.N. Wernery, U. (2016). *Glanders and the risk for its introduction through the* International movement of horses. *Equine Veterinary Journal*, **48:** : 654-658.
27. Scholz, H.C., Pearson, T., Hornstra, H., Projahn, M., Terzioglu, R., Wernery, R., Georgi, E., Riehm, J.M., Wagner, D.M.Keim, P.S. (2014). Genotyping of *Burkholderia mallei* from an outbreak of glanders in bahrain suggests multiple introduction events. *PLoS neglected tropical diseases*, **8**: .e3195.
28. Laroucau, K., Aaziz, R., Vorimore, F., Varghese, K., Deshayes, T., Bertin, C., Delannoy, S., Sami, A.M., Al Batel, M.El Shorbagy, M. (2021). A genetic variant of *Burkholderia mallei* detected in kuwait: Consequences for the pcr diagnosis of glanders. *Transboundary and Emerging Diseases*, **68**: 960-963.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2, Autumn & Winter 2021

Laboratory characterization of the most recent successfully-collected isolates of *Burkholderia mallei* from solipede infections, a Persian update

Shojaat Dashtipour[1], Nader Mosavari[2], Nafiseh Shakibamehr[1], Mehdi Babaei[1], Samerand Reshadi[1], Keyvan Tadayon[3], Rohollah Keshavarz[4*]

1. *Laboratory expert, National Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education & Extension Organization, Karaj, Iran*
2. *Associated Professor in Microbiology, National Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education & Extension Organization, Karaj, Iran*
3. *Associated Professor in Microbiology, Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education & Extension Organization, Karaj, Iran*
4. *Assistant Professor in Biotechnology, National Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education & Extension Organization, Karaj, Iran*

Received: 5 September2021 *Accepted: 21 June 2022*

Abstract

The Middle-East, known-to-be the birthplace for animal domestication, is among the few remained geographical theaters in the world where glanders-stricken solipede and human cases are still reported. In the Persian environment with some 60 years of maleination test history in its horse, mule and donkey populations, mini or midi outbreaks of glanders are seen now and then mostly in the Western and central regions. This work was aimed to characterize the phenotypic and genotypic properties of the most recently-collected isolates of Burkholderia mallei in Iran (A tiger sample and 3 horse samples). Bacterial culture, Biochemical tests, complement fixation test and Western blot, Flip 407-PCR, Bim A-PCR and also Strauss reaction tests were included in the assessment. The results obtained from experiments conducted on four isolates from Tehran, Kordan, Oshnavieh and Semirum outbreaks, displayed the expected characteristics of B. mallei. Whether our isolates of interest represent the local/regional population(s) of B. mallei, we assume further molecular epidemiology studies will enable us to address.

Keywords: Glanders, Solipedes, Iran

**Corresponding author: Rohollah Keshavarz*
Address: Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
E. mail: piroozkeshavarz@gmail.com