



"مقاله پژوهشی"

ارزیابی سرولوژی نمونه‌های اسب مشکوک به مسمومیت با استفاده از وسترن بلات

نفیسه شکیبامهر^۱، ناصر هرزندی^۲، نادر مصوری^۳ و ناهید مژگانی^۴

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، (نویسنده مسوول: nasharzan@gmail.com)

۳- دانشیار، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

۴- دانشیار، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۵

صفحه: ۱۲۴ تا ۱۲۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: بورخولدریا مالئی، عامل اتیولوژیک بیماری مسمومیت است. تشخیص بالینی و باکتری‌شناسی مسمومیت در مراحل اولیه بیماری دشوار است. برخی از روش‌ها مانند آزمایش ثبوت مکمل به دلیل سختی آزمایش و نتایج مثبت کاذب برای متخصصان دامپزشکی دردسرساز شده و موجب ضرر و زیان مالی صاحبان حیوانات می‌شود. یکی دیگر از روش‌های تشخیصی آزمایش مالیتیناسیون است که به پرسنل آموزش دیده نیاز دارد. بنابراین، برای تشخیص سریع و دقیق بیماری، به ویژه در مناطقی که نمی‌توان از حیوانات نگهداری کرد، باید از روش‌های جدید برای شناسایی بیماری استفاده کرد. وسترن بلات یک آزمایش تشخیصی سرولوژی است و توسط سازمان جهانی بهداشت حیوانات توصیه شده است. هدف از این مطالعه، به کارگیری روش وسترن بلات با استفاده از لیپوپلی ساکارید حاوی آنتی ژن بورخولدریا مالئی، بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ۷۵ سرم از جمعیت مختلف اسب‌ها از چندین منطقه جغرافیایی ایران جمع آوری شد. ویژگی و حساسیت تست‌های آزمایش ثبوت مکمل، الایزا و وسترن بلات برای تشخیص مسمومیت با استفاده از سرم‌های تهیه شده، مقایسه شدند. آزمایش الایزا براساس آنتی ژن‌های بورخولدریا مالئی و وسترن بلات با استفاده از آنتی ژن خالص شده بورخولدریا مالئی حاوی لیپوپلی ساکارید انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که آزمون وسترن بلات و آزمون الایزا ویژگی بالاتری نسبت به آزمایش ثبوت مکمل داشتند. حساسیت روش الایزا بر اساس آنتی ژن‌های بورخولدریا مالئی در مقایسه با آزمایش ثبوت مکمل و آزمون وسترن بلات بالاتر بود. در نهایت حساسیت و ویژگی به ترتیب برای آزمایش ثبوت مکمل (۹۲/۳۱٪ و ۹۸/۳۸٪)، وسترن بلات (۹۲/۳۱٪، ۱۰۰٪) و الایزا (۱۰۰٪ و ۱۰۰٪) به دست آمد.

نتیجه‌گیری: آزمایش ثبوت مکمل برای مسمومیت هنوز روش تجویز شده سرولوژیکی برای اهداف تجاری به منظور تأیید سلامت حیوانات از نظر بیماری است. اما به دلیل حفظ امنیت زیستی کلی‌های ارزشمند و گران قیمت اسب که پرورش آنها توسط اسب داران حرفه‌ای در مناطق مختلف ایران رو به توسعه می‌باشد بر اهمیت اعمال دقیق‌تر و هوشمندانه برنامه کنترل و ریشه‌کنی بیماری و ارتقاء توانایی‌های آزمایشگاهی تشخیص بیماری می‌افزاید تا امکان شناخت بهتر عامل بیماری و استفاده و بهینه سازی روش‌های تشخیصی مسمومیت در کشور فراهم شود. بنابراین، تلاش برای بهبود و بهینه سازی بیشتر الایزا و وسترن بلات می‌بایست ادامه یابد.

واژه‌های کلیدی: بورخولدریا مالئی، مسمومیت، وسترن بلات

مقدمه

مسمومیت^۱ بیماری باکتریایی زئونوز^۲ و کشنده در تک سمیان است و عامل آن باکتری بورخولدریا مالئی^۳ می‌باشد (۱). در بیش‌تر موارد، بیماری منجر به مرگ می‌شود. جانوران آلوده یا حاملینی که از بیماری جان سالم به‌در برده‌اند، عمده‌ترین منابع عفونت به شمار می‌آیند (۱۴).

رخداد بیماری یا به گونه سپتی سمی (شکل حاد بیماری) یا به گونه باکتری می (شکل مزمن بیماری) است. عامل بیماری همواره در ریه جایگزین شده ولی پوست و مخاط بینی نیز در زمره اندام‌های درگیر قرار دارند. ممکن است دیگر احشاء نیز محل پایه‌ریزی ندول‌های تیپیک گردند (۲۰). با وجودی که انسان‌ها به این بیماری خیلی حساس نیستند ولی از راه جراحات پوستی، به شکل گرانولوماتوز دچار بیماری می‌شوند. به‌طور کلی اسب‌دارها که در ارتباط مستقیم و تنگاتنگ با اسب‌ها هستند و به‌ویژه دامپزشکانی که بدون دقت عمل لازم اقدام به کالبد گشایی حیوانات آلوده می‌کنند در معرض خطر هستند (۱۸).

اهمیت تشخیص سریع این بیماری به دلیل، افزایش ناگهانی در منطقه خاورمیانه، شیوع فزاینده بیماری در ده سال اخیر در ایران، همه‌گیری حادث شده در گاوشت‌خواران باغ وحش تهران، احتمال ورود عامل این بیماری از کشورهای همسایه با ورود تک سمی‌های غیر مجاز به کشور و همچنین اهمیت

ویژه بورخولدریا مالئی، از نظر قابلیت استفاده از آن به‌عنوان یک سلاح بیولوژیک بیش از پیش مطرح می‌باشد (۱۲، ۱).

در زمینه تشخیص بیماری مسمومیت، کشت به‌عنوان اصلی‌ترین روش تشخیصی می‌باشد (۱۱)، لیکن نظر به اینکه در اسب‌ها معمولاً بیماری به شکل مزمن و یا نهفته دیده می‌شود، در این گونه از حیوانات تشخیص بر مبنای روش‌های سرولوژی یا ازدیاد حساسیت تأخیری است (۱۶، ۱۹). از این نظر که ارزش اقتصادی این گونه حیوانی بسیار بالا می‌باشد، لذا می‌توان از چند روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالای ۹۰٪ استفاده کرد تا با مشابه شدن جواب چند آزمون، صحت جواب آزمایش‌ها را افزایش داد و سپس جهت شناسایی و معدوم سازی حیوان آلوده اقدام کرد.

مالیتیناسیون، تستی که در حال حاضر در کشور انجام می‌شود، به حداقل ۴۸ ساعت زمان جهت بررسی نیاز دارد و قضاوت آن منحصرأ باید توسط دکتر دامپزشک دوره دیده و ورزیده انجام گیرد که کار بسیار مشکلی است و احتمال خطای آن بالا می‌باشد. در تست‌هایی دیگر مانند ثبوت مکمل (CFT) نتایج مثبت کاذب وجود دارد. تست‌های دیگری که همچنان برای تشخیص بیماری مسمومیت به کار می‌روند، مانند تست آگلوتیناسیون رزنگال، تست هم‌آگلوتیناسیون غیرمستقیم، کاتر ایمونوالکتروفورز و آنتی بادی فلورسنت غیرمستقیم نیز دارای نواقصی هستند و حساسیت و ویژگی پایینی دارند (۱۱).

و متعاقباً با استفاده از یک شیکر اوربیتالی یک شبانه روز در دمای اتاق همگن گردید. غیرفعال سازی باکتری ها توسط آزمایش استریلیتی تأیید شد. سلول ها با سانتریفوژ در $g \times 3500$ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شدند و مواد مایع رویی دور ریخته شد. اجزای (ناخالصی های) محلول با سه مرحله سانتریفوژ و شستشوی متوالی با 9×10^6 میلی لیتر با بافر فسفات (pH ۷, PBS) در $RPM \times 3500 - 4000$ و به مدت ۱۰ دقیقه حذف شدند. رسوب (پلت) حاوی LPS در 9×10^6 میلی لیتر PBS سوسپانسیون گردید. دو مرحله استخراج بیشتر با افزودن یک حجم ۳۷٪ فرمالدئید به دو حجم سلول های سوسپانسیون شده در PBS استفاده شد. با سه مرحله شستشوی متوالی با PBS، اجزاء سلول محلول و فرمالدئید حذف شدند. پس از آخرین مرحله شستشو، پلت در PBS دوباره سوسپانسیون گردید. تخلیص بهینه با استفاده از 9×10^6 سلول بر میلی لیتر (مقیاس ۳ مک فارلند) یا کمتر به دست آمد (۱۰).

سنجش غلظت پروتئین

غلظت کل پروتئین های استخراج شده باکتری با روش لوری و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد سنجیده شد (۳).

الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلات

نمونه ها (چند غلظت از LPS خالص شده) بر روی ژل SDS-PAGE لود شدند. غلظت نهایی ژل برای ژل جداکننده $w/v \times 12$ و برای ژل جمع کننده $w/v \times 4$ بود. جزئیات کامل روش مورد استفاده در تهیه ژل و انجام الکتروفورز قبلاً شرح داده شده است (۴). برای رنگ آمیزی ژل الکتروفورز شده از روش رنگ آمیزی کوماسی بلو و نیترات نقره آمونیاکی استفاده شد (۷).

برای انجام آزمایش وسترن بلات، LPS به غشاء نیتروسلولز PVDF، با اندازه منافع $0.45 \mu m$ میکرومتر به مدت دو ساعت و در $30^\circ C$ ولت انتقال یافت. غشاء در محلول مسدود کننده (شیر خشک ۵-۳٪ یا BSA ۳٪ بدون چربی در TBST) به مدت یک شبانه روز در $4^\circ C$ درجه سانتی گراد مسدود شد. بعد از سه مرحله شستشو با بافر شستشو (TBST)، غشاء به صورت نوارهای 3×3 میلی متری برش داده شد و در دمای $-8^\circ C$ درجه سانتی گراد ذخیره گردید و برای تجزیه و تحلیل ایمنوبلات استفاده شد.

نوارها با سرم های مشکوک (آنتی بادی اولیه) به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و پس از آن سه مرحله شستشو (هر مرحله ۵ دقیقه) در بافر شستشو TBST شامل تریس 50 mM ، NaCl 150 mM و تویین ۲۰ با غلظت ۲٪ انجام گرفت.

سپس نوارها به مدت یک ساعت در دمای اتاق در آنتی بادی کوژوگه شده با horseradish Peroxidase (AbD Serotec, United Kingdom) با رقت $1:5000$ قرار گرفتند. پس از سه مرحله شستشوی اضافی، نوارها با محلول $3,3'$ -diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB) - H_2O_2 (Fluka, Cat No. 32741) به عنوان سوپسترا رنگ آمیزی شدند. پس از ۳ دقیقه، شستشو نوارها با آب مقطر، انجام شد و رنگ آمیزی متوقف گردید. اگر الگوی باندهای

اخیراً تکنولوژی میکروآرای نیز برای تشخیص های سرمی بیماری مسموم و میلوئیدوز به کار گرفته شده است که بر مبنای آنتی ژن پلی ساکاریدی می باشند، اما این تکنیک ها هم به دلیل گران قیمت بودن، روش مناسبی برای ارزیابی سرم های مورد آزمایش به طور روتین نیستند (۱۷).

بنابراین، در مناطق مرزی یا در مناطقی با شیوع بسیار کم مسموم، آزمایشات بسیار ویژه ای برای به حداقل رساندن نتایج مثبت کاذب مورد نیاز است. در نتیجه، لزوم راه اندازی و ارزیابی تست های سرولوژی دارای ویژگی بالا مانند تست وسترن بلات به منظور حذف نتایج مثبت کاذب، امری ضروری می باشد. سنجش LPS بورخولدریا مائی بر مبنای تست وسترن بلات، روشی ارزان، از نظر تولید آسان و یک سیستم کاربر پسند بوده که در گذشته راه اندازی شده ولی تا این زمان بر روی تعداد بالای سرم های مثبت و منفی اسب ها ارزیابی نشده اند. این روش ارزیابی سرمی برای اولین بار است که در ایران انجام می شود و تا به حال تنها در کشور آلمان در آزمایشگاه مرجع لوفلر انجام شده است. ثابت گردیده که این تکنیک دارای ویژگی بسیار بالایی است و قادر است با حذف موارد مثبت کاذب حاصل از CFT، به عنوان تست تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). مطالعه حاضر به منظور ارزیابی سرولوژی نمونه های اسب مشکوک به مسموم با استفاده از وسترن بلات صورت گرفت.

مواد و روش ها

ایمن سازی اسب

برای تولید سرم های کنترل مثبت، یک اسب به صورت زیر جلدی با استفاده از مخلوطی از سوسپانسیون های خام سویه های بورخولدریا مائی غیرفعال شده با حرارت $cfu/ml \times 10^9$ ادجوانت شده با روغن آرلاسل ایمن سازی گردید. ایمن سازی به صورت هفتگی و به مدت هفت هفته با 7×10^9 cfu/ml میلی لیتری از آنتی ژن حاوی غلظت افزایشی $cfu/ml \times 10^9$ تا 10^4 انجام شد. تیترا متوسط وسترن بلات دو بار در هفته و به مدت ۱۰ هفته پس از اولین ایمن سازی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نمونه ها

طی سال های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۸ تعداد ۷۵ سرم از جمعیت اسب های مختلف در چندین منطقه جغرافیایی ایران شامل قم، بوشهر، تهران، کرج، کرمانشاه و اشنویه جمع آوری شد. حساسیت روش وسترن بلات با استفاده از ۷۵ سرم مورد آزمایش قرار گرفت.

آماده سازی آنتی ژن برای روش وسترن بلات

سویه های بورخولدریا مائی در شرایط هوازی در پلیت آگار خون دار یک شبانه روز و در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و رشد آنها بررسی شد. برای خالص سازی LPS یک لوپ 10 mL میکرولیتری پر از کلنی باکتریایی در 6 mL محلول نمکی $(0.9\% \text{ NaCl}, pH 7)$ تا میزان چگالی قابل مقایسه با مقیاس 0.4 مک فارلند تهیه گردید. مقدار 3 mL میلی لیتر فرمالدئید 3.7% برای دستیابی به غلظت نهایی فرمالدئید $1.2/3\%$ اضافه شد. سوسپانسیون کاملاً ورتکس شد

$$\text{Specificity} = \frac{\text{True negative}}{(\text{True negative} + \text{False positive})}$$

نتایج و بحث

غلظت پروتئین (آنتی ژن) در حدود ۰/۶ mg/ml بدست آمد که با جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در آزمون وسترن بلات، ۱۹ نمونه مثبت بدست آمد. نتایج بیشتر در جدول ۱ آورده شده است.

مارکر LPS در ناحیه ۲۵ تا ۷۰ کیلو دالتون به وضوح قابل مشاهده باشد، واکنش مثبت است و در صورت مشاهده واکنش رنگی ضعیف، نتیجه مشکوک می‌باشد و در صورت عدم مشاهده، واکنش منفی است. حساسیت و ویژگی نسبی روش با محاسبه زیر تعیین شد و نتایج به صورت درصد بیان گردید (۲):

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True positive}}{(\text{True positive} + \text{False negative})}$$

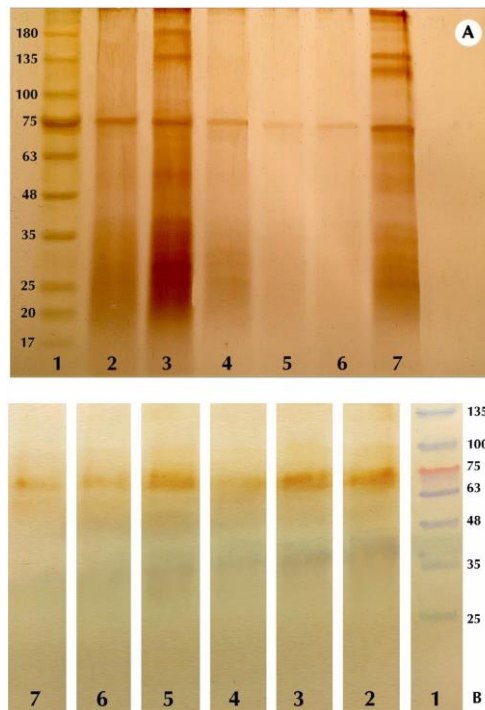
جدول ۱- نتایج وسترن بلات

Table 1. Western blot results

ویژگی (%)	حساسیت (%)	منفی	کاذب	مثبت	تعداد	تست
۱۰۰	۹۲/۳۱	۶۲	۱	۱۲	۷۵	وسترن بلات

سرم کنترل، ملیونیدوز و سایر سرم‌های کنترل، هیچ گونه واکنشی با پروتئین نشان ندادند و سرم‌های دارای واکنش در محدوده ۲۰ تا ۶۰ کیلو دالتون مشاهده شدند (شکل ۲).

با لود کردن نمونه‌ها (چند غلظت از LPS خالص شده) بر روی ژل SDS-PAGE، باندها در محدوده ۲۰ تا ۶۰ کیلو دالتون نمایان شدند، با انجام وسترن بلات، نتایج نشان داد که



شکل ۲- (A) SDS-PAGE [۱- مارکر؛ ۲- سویه استاندارد (RTCC 2375)؛ ۳ تا ۷ نمونه سرم‌ها] و (B) تست وسترن بلات برای سرم‌ها [۱- مارکر؛ ۲- کنترل مثبت سویه استاندارد (RTCC 2375)؛ ۳ تا ۷ سرم‌ها]

Figure 2. (A) SDS-PAGE [1- Marker; 2- Standard strain (RTCC 2375); 3 to 7 samples of serums] and (B) Western blot test for serums [1- marker; 2- Standard strain positive control (RTCC 2375); 3 to 7 serum]

همین دلیل روش‌های متنوعی مانند تزریق داخل جلدی پلک پایین در اسب (تست مالئیناسیون)، آزمون CF و الیزا جهت شناسایی عامل بیماری در سال‌های اخیر به کار گرفته شده است (۲۰، ۱۹، ۹).

در ایران تا این لحظه تلاشی برای به دست آوردن تستی قابل اطمینان و سریع جهت سرعت در تشخیص صورت نگرفته است. با انجام این مطالعه، نتایج نشان داد که می‌توان از تست وسترن بلات در جهت تشخیص سریع استفاده کرد و در کنار

مسمومیت یکی از خطرناک‌ترین و قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیردار زئونوز در تک سمی‌ها می‌باشد که تاکنون موارد زیادی از تلفات در تک سمیان و انسان را ایجاد نموده است. قطعی‌ترین راه تشخیصی هر گونه بیماری عفونی مانند مسمومیت، با جدا سازی عامل بیماری است لیکن با توجه به مخاطره آمیز بودن جداسازی بورخولدریا مالئی از بافت‌های آلوده حیوان مبتلا، بایستی کار با این باکتری در آزمایشگاه‌های واجد سطح سه ایمنی زیستی انجام شود. به

که حساسیت و ویژگی این تست‌ها را به ۱۰۰ درصد رساندند. در تحقیق حاضر مشخص شد که نتایج پال و همکاران درست می‌باشد و به‌طوری که با به کار گیری LPS، ویژگی تست‌ها بالا بود. اما در مورد حساسیت باید آزمایشات بیشتری انجام گیرد و با تولید و تجاری شدن این آنتی ژن گامی به‌سوی تشخیص قطعی بورخولدریا مالتی برداشته شود (۱۶).

ال‌سچتر و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با مقایسه تست وسترن بلات با CF به این نتیجه رسیدند که اگرچه تست CF به دلیل حساسیت بالا به‌عنوان تست انتخابی و روتین برای تشخیص مشمشه به‌کار می‌رود ولی به دلیل نتایج مثبت کاذب بالا نیاز به تست تأییدی با ویژگی و مثبت حقیقی بیشتر دارد که در این تحقیق تست وسترن بلات بررسی و پیشنهاد شد (۹).

با توجه به بالا بودن نتایج مثبت کاذب در تست‌هایی مانند CF پیشنهاد می‌شود با حذف تست مالتیناسیون و در نتیجه آن، حذف خاطره ایمنی در بدن حیوان مشکوک به بیماری، تستی با ویژگی بالاتر مانند وسترن بلات را در کنار آن به کار برد. در مطالعه حاضر نیز با بدست آوردن ویژگی ۱۰۰٪ برای تست وسترن بلات، می‌توان نتیجه گرفت که این تست در کنار دیگر تست‌ها تشخیص را دقیق‌تر می‌نماید.

در حال حاضر تست مالتیناسیون مورد پذیرش OIE، که با کارگیری مالتین PPD است (۶) به‌دلیل وجود برخی دشواری‌ها، تولید این فراورده به صورت آزمایشگاهی محقق شده ولی متأسفانه به دلیل خطرات و مشکلات تولید هنوز در مرحله تولید صنعتی قرار نگرفته است. جهت به روز نمودن آزمایش‌های موجود مطابق با آزمایشگاه رفرانس OIE می‌بایستی روش تشخیصی وسترن بلات برای مشمشه نیز طراحی و راه اندازی گردد، لذا انجام چنین تحقیقاتی برای به روز نمودن روش‌های تشخیصی موجود در ایران بسیار الزامی است.

در نهایت، می‌بایستی با انجام موازی روش‌های تشخیصی که دارای حساسیت و ویژگی بالای ۹۰٪ هستند و با مشابه شدن جواب چند آزمون، صحت جواب آزمایش‌ها را افزایش داد.

تست‌های دیگر نتیجه کامل‌تر و قابل اعتمادتری حاصل نمود. در مطالعه حاضر با جداسازی LPS باکتری و استفاده از آن در تست وسترن بلات، سرم دارای واکنش مثبت شناسایی شد. این امر می‌تواند راه‌کارهای جدید برای کنترل، پیشگیری و در نهایت درمان بهتر را با استفاده از پروتئین‌های سبک وزن سوبه بورخولدریا مالتی و جدایه‌های آن، ایجاد نماید.

استفاده از LPS در تست وسترن بلات می‌تواند برای تشخیص آنتی‌بادی ضد بورخولدریا مالتی در سرم به کار رود. تست‌های موجود برای تشخیص بورخولدریا مالتی در موارد بسیاری دارای نتایج مثبت کاذب است که می‌توان با استفاده از وسترن بلات به درستی نمونه‌های آلوده را تشخیص داد. به طوری که با خالص سازی پروتئین‌های سبک وزن باکتری بورخولدریا مالتی، ویژگی و حساسیت در حدود ۱۰۰٪ ایجاد نمود و این مزیت برای اعلام موارد مثبت و همچنین حذف نتایج مثبت کاذب در CFT به کار گرفته شود.

نارین و همکارانش با انجام تست CF، مالتیناسیون و تست‌های سرولولیک برای تشخیص مشمشه و مقایسه آنها با هم به این نتیجه رسیدند که مالتیناسیون حساسیتی در حدود ۷۶٪ و تست CF حساسیتی در حدود ۹۱/۴ درصد را برای تشخیص مشمشه داشت. بقیه تست‌های سرولولی نیز حساسیتی بالای ۹۰ درصد داشتند. ویژگی تست مالتیناسیون ۹۰٪ و تست CF ۱۰۰٪ بود (۱۵). با مقایسه نتایج این تحقیق با پژوهش انجام شده مشخص شد که حساسیت این تست‌های انجام شده به مراتب بالاتر می‌باشد اما ویژگی این تست‌ها پایین‌تر است و همچنین می‌توان نتیجه گرفت که اگر تست‌های تشخیصی با هم اجرا شوند، احتمال تشخیص مشمشه بالا می‌رود.

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ انجام شد، دکتر پال و همکارانش اظهار داشتند که پایین بودن ویژگی تست‌هایی نظیر CF و الایزا به دلیل استفاده از آنتی ژن Wholl cell می‌باشد. آنها پس از مورد آزمایش قرار دادن ۱۲۳ اسب مشکوک و تشخیص ۲۱ اسب مبتلا به مشمشه، با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک و کلون کردن ژن موثر موفق به تولید و خالص سازی پروتئین نوترکیب به عنوان آنتی ژن جدید شدند.

منابع

1. Akbarein, H., A.R. Bahonar, A. Dabbagh Moghaddam, Z. Bolouki and S.J. Hosseini Shokouh. 2012. Glanders, a new vision on an old biological weapon. Journal of Army University of Medical Sciences, 10(2): 143-162.
2. Altman, D.G. and J.M. Bland. 1994. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. British Medical Journal, 308(6943): 1552-1553.
3. Babaie, M., H. Zolfagharian, M. Zolfaghari and S. Jamili. 2019. Biochemical, hematological effects and complications of *Pseudosynanceia melanostigma* envenoming. Journal of pharmacopuncture, 22(3): 140-146.
4. Babaie, M., A. Ghaem panah, Z. Mehrabi and A. Mollaei. 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(5): 460-477.
5. Bach, E., F.H. Sant'Anna, J.F. Magrich Dos Passos, E. Balsanelli and V.A. de Baura. 2017. Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. nov. Pathogens and Disease, 31: 75(6): 1-8.
6. Da Silva, K.P., G.M. de Campos Takaki, L.B. da Silva, T.N. Saukas, A.S. Santos and R.A. Mota. 2013. Assessment of the effectiveness of the PPD-mallein produced in Brazil for diagnosing glanders in mules. Brazilian Journal of Microbiology, 44(1): 179-181.

7. De Moreno, M.R., J.F. Smith and R.V. Smith. 1986. Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(9): 907-911.
8. Eberl, L. and P. Vandamme. 2016. Members of the genus *Burkholderia*: Good and bad guys. *F1000Research*, 5: 1-10.
9. Elschner, M.C., K. Laroucau, H. Singha, B.N. Tripathi, M. Saqib and I. Gardner. 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(4): 1-9.
10. Elschner, M.C., H.C. Scholz, F. Melzer, M. Saqib, P. Marten and A. Rassbach. 2011. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Veterinary Research*, 7(4): 1-6.
11. Karimi, A. and N. Mosavari. 2019. Development of Rose Bengal test against mallein test for rapid diagnosis of equine glanders. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7): 1969-1974.
12. Khaki, P., N. Mosavari, N.S. Khajeh, E. Emam, M. Ahouran and S. Hashemi. 2012. Glanders outbreak at Tehran Zoo, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(1): 3-7.
13. Kinoshita, Y., A.K. Cloutier, D.A. Rozak, S.R. Khan, H. Niwa and E. Uchida-Fujii. 2019. A novel selective medium for the isolation of *Burkholderia mallei* from equine specimens. *BMC Veterinary Research*, 15(133): 1-9.
14. Mardani, M. and M. Kamali. 2011. A review on glanders: re-emerging threat. *Research in Medicine*, 35(3): 174-181.
15. Naureen, A., M. Saqib, G. Muhammad, M.H. Hussain and M.N. ASI. 2007. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J VET Diagn Invest*, 19(4): 362-367.
16. Pal, V., S. Kumar, P. Malik and G.P. Rai. 2012. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(8): 1193-1198.
17. Parthasarathy, N., D. DeShazer, M. England and D.M. Waag. 2006. Polysaccharide microarray technology for the detection of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* antibodies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56(3): 329-332.
18. Renella, R., J.M. Perez, S. Chollet-Martin, S. Sarnacki, A. Fischer, S. Blanche, J.L. Casanova and C. Picard. 2006. *Burkholderia pseudomallei* infection in chronic granulomatous disease. *European Journal of Pediatrics*, 165(3): 175-177.
19. Sprague, L.D., R. Zachariah, H. Neubauer, R. Werner, M. Joseph and H.C. Scholz. 2009. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses *BMC Veterinary Research*, 5(32): 1-8.
20. Van Zandt, K.E., M.T. Greer and H.C. Gelhaus. 2013. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8: 1-9.
21. Whitby, P.W., H.L. Dick and P.W. Campbell. 1998. Comparison of culture and PCR for detection of *Burkholderia cepacia* in sputum samples of patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, 36(6): 1642-1645.
22. Wright, R.M., J.E. Moore, A. Shaw, K. Dunbar and M. Dodd. 2001. Improved cultural detection of *Burkholderia cepacia* from sputum in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 803-805.

Serological Evaluation of Horse Specimens Suspected of Glanders using Western Blot

Nafiseh Shakibamehr¹, Naser Harzandi², Nader Mosvari³ and Naheed Mojangi⁴

1- Department of microbiology, karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Assistant professor, Department of microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran,
(Corresponding Author: nasharzan@gmail.com)

3- Associate professor, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4- Associate professor, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 18 November, 2020 Accepted: 26 Jun, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: *Burkholderia mallei*, is the etiologic agent of the glanders disease. Clinical and bacteriological diagnosis of glanders is difficult in the early stages of the disease. Some methods such as Complement fixation test (CFT) due to false positive results and troublesome for veterinary authorities and cause financial losses to animal owners, the other one is Malleination test, which requires appropriate equipment and efficient laboratory personnel. Therefore, in order to quickly and accurately diagnose the disease, especially in areas that cannot be kept animals, new methods should be used to identify the disease. The Western blot is a serological diagnostic test and has been recommended by the World Organization for Animal Health (OIE). The aim of this study was to apply Western blot assay using purified lipopolysaccharide (LPS) containing antigen of *Burkholderia mallei* was designated.

Material and Methods: In this study, a total of 75 sera were collected from different horse populations from several geographical areas of Iran. Specificity and sensitivity of the Complement fixation test, ELISA and a Western blot were compared for serodiagnosis of glanders. ELISA test was based on *B. mallei* antigens and Western blot by using of a purified LPS-containing *B. mallei*-antigen.

Results: The Western blot and ELISA were more specific than the Complement fixation test. ELISA based on *B. mallei* antigens had more sensitivity compared to Complement fixation test and Western blot. Finally, sensitivity and specificity were obtained for Complement fixation test (92.31% and 98.38%), Western blot (92.31%, 100%) and (100% and 100%) respectively.

Conclusion: Complement fixation test for glanders is still the prescribed serological method for commercial purposes, which is used to confirm the health of animals. However, in order to maintain the biosafety of valuable and expensive horse colonies, it is important to implement a more accurate and intelligent disease control and eradication program. This enhances the laboratory diagnostic capabilities to better understand the cause of the disease and to use and optimize the diagnostic methods of glanders in the country. Therefore, efforts to further improve and optimize ELISA and Western blotting should be continue.

Keywords: *Burkholderia mallei*, Glanders, Western blot