دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

ارزیابی سرولوژی نمونه‌های اسب مشکوک به مشمشه 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 واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، تهران، ایران
۴- دانشیار، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، مؤسسه تحقیقات واکسن 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 مشمشه است. تشخیص بالینی و باکتری‌شناسی مشمشه 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 می شود. یکی دیگر از روش‌های تشخیصی آزمایش مالئیناسیون 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 آنتی‌ژن *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 مشمشه 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 مشمشه هنوز روش تجویز شده سرولوژیکی برای اهداف تجاری به منظور تأیید سلامت حیوانات از نظر بیماری است. اما به دلیل حفظ امنیت زیستی کلنی‌های 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 مشمشه در کشور فراهم شود. بنابراین، تلاش برای بهبود و بهینه سازی بیشتر الایزا و وسترن بلات می بایست ادامه یابد.

واژه‌های کلیدی: *بورخولدریا مالئی*، مشمشه، وسترن بلات

مقدمه

مشمشه[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 باکتریمی (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. به‌طورکلی 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 گوشتخواران 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 مشمشه، کِشت 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 تاخیری است (۱۹،۱۶). از این نظرکه 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.

مالئیناسیون، تستی که در حال حاضر در کشور انجام می‌شود، به حداقل ۴۸ ساعت زمان جهت بررسی نیاز دارد و قضاوت آن منحصراً 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 مشمشه به کار می‌روند، مانند تست آگلوتیناسیون رزبنگال، تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، کانتر ایمنوالکتروفورز وآنتی بادی فلورسنت غیرمستقیم نیز دارای نواقصی هستند و حساسیت و ویژگی پایینی دارند (۱۱).

1- Glanders 2- Zoonosis 3- *Burkholderia mallei*

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.5.1]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.124]

اخیراً تکنولوژی میکروواری نیز برای تشخیص‌های سرمی بیماری مشمشه و میلوئیدوز به کار گرفته شده است که بر مبنای آنتی ژن پلی‌ساکاریدی می‌باشند، اما این تکنیک‌ها هم به دلیل گران قیمت بودن، روش مناسبی برای ارزیابی سرم‌های مورد آزمایش به طور روتین نیستند (۱۷).

بنابراین، در مناطق مرزی یا در مناطقی با شیوع بسیار کم مشمشه، آزمایشات بسیار ویژه‌ای برای به حداقل رساندن نتایج مثبت کاذب مورد نیاز است. در نتیجه، لزوم راه‌اندازی و ارزیابی تست‌های سرولوژی دارای ویژگی بالا مانند تست وسترن بلات به منظور حذف نتایج مثبت کاذب، امری ضروری می‌باشد. سنجش LPS *بورخولدریا مالئی* 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 سرم‌های مثبت و منفی اسب‌ها ارزیابی نشده‌اند. این روش ارزیابی سرمی برای اولین بار است که در ایران انجام می‌شود 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، به‌عنوان تست تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). مطالعه حاضر به منظور ارزیابی سرولوژی نمونه‌های اسب مشکوک به مشمشه با استفاده از وسترن بلات صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

ایمن‌سازی اسب

برای تولید سرم‌های کنترل مثبت، یک اسب به صورت زیر جلدی با استفاده از مخلوطی از سوسپانسیون‌های خام سویه‌های *بورخولدریا مالئی* غیرفعال شده با حرارت (10^9 cfu/ml) ادجوانت شده با روغن آرلاسل ایمن‌سازی گردید. ایمن‌سازی به صورت هفتگی و به مدت هفت هفته با ۷ دوز ۱/۵ میلی‌لیتری از آنتی‌ژن حاوی غلظت افزایشی (10^3 تا 10^9 cfu/ml) انجام شد. تیتر توسط وسترن بلات دو بار در هفته و به مدت ۱۰ هفته پس از اولین ایمن سازی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نمونه‌ها

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

آماده‌سازی آنتی‌ژن برای روش وسترن بلات

سویه‌های *بورخولدریا مالئی* در شرایط هوازی در پلیت آگار خون‌دار یک شبانه روز و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و رشد آنها بررسی شد. برای خالص‌سازی LPS، یک لوپ ۱۰ میکرولیتری پر از کلنی باکتریایی در ۶ میلی‌لیتر محلول نمکی (۰/۹٪ NaCl، pH ۷) تا میزان چگالی قابل مقایسه با مقیاس ۰/۴ مک فارلند تهیه گردید. مقدار ۳ میلی‌لیتر فرمالدئید ۳۷٪ برای دستیابی به غلظت نهایی فرمالدئید ۱۲/۳٪ اضافه شد. سوسپانسیون کاملاً ورتکس شد و متعاقباً با استفاده از یک شیکر اوربیتالی یک شبانه روز در دمای اتاق همگن گردید. غیرفعال‌سازی باکتری‌ها توسط آزمایش استریلیتی تأیید شد. سلول‌ها با سانتریفوژ در ۳۵۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری شدند و مواد مایع رویی دور ریخته شد. اجزای (ناخالصی‌های) محلول با سه مرحله سانتریفوژ و شستشوی متوالی با ۹ میلی‌لیتر با بافر فسفات (PBS، pH۷) در RPM ۳۵۰۰–۴۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه حذف شدند. رسوب (پلت) حاوی LPS در ۹ میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون گردید. دو مرحله استخراج بیشتر با افزودن یک حجم ۳۷٪ فرمالدئید به دو حجم سلول‌های 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 9×10^8 سلول بر میلی‌لیتر (مقیاس ۳ مک فارلند) یا کمتر به دست آمد (۱۰).

سنجش غلظت پروتئین

غلظت کل پروتئین‌های استخراج شده باکتری با روش لوری و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد سنجیده شد (۳).

الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلات

نمونه‌ها (چند غلظت از LPS خالص شده) بر روی ژل SDS-PAGE لود شدند. غلظت نهایی ژل برای ژل جداکننده ۱۲٪ w/v و برای ژل جمع‌کننده ۴٪ w/v بود. جزئیات کامل روش مورد استفاده در تهیه ژل و انجام الکتروفورز قبلاً شرح داده شده است (۴). برای رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز شده از روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو و نیترات نقره آمونیاکی استفاده شد (۷).

برای انجام آزمایش وسترن بلات، LPS به غشاء نیتروسلولز PVDF، با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر به مدت دو ساعت و در ۳۰ 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 ۴ درجه سانتی‌گراد مسدود شد. بعد از سه مرحله شستشو با بافر شستشو (TBST)، غشاء به صورت نوارهای ۳ میلی‌متری برش داده شد و در دمای ۸–۲ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید و برای تجزیه و تحلیل ایمنوبلات استفاده شد.

نوارها با سرم‌های 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 ۵۰ میلی‌مولار، NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار و توین ۲۰ با غلظت ۲٪ انجام گرفت.

سپس نوارها به مدت یک ساعت در دمای اتاق در آنی بادی کوژوگه شده با horseradish Peroxidase (AbD Serotec, United Kingdom) با رقت ۱:۵۰۰۰ قرار گرفتند. پس از سه مرحله شستشوی اضافی، نوارها با محلول ۳،۳– diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB) - H2O2 (Fluka, Cat No. 32741) به‌عنوان سوبسترا رنگ آمیزی شدند. پس از ۳ دقیقه، شستشو نوارها با آب مقطر، انجام شد و رنگ‌آمیزی متوقف گردید. اگر الگوی باندهای

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.5.1]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.124]

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):

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

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

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.

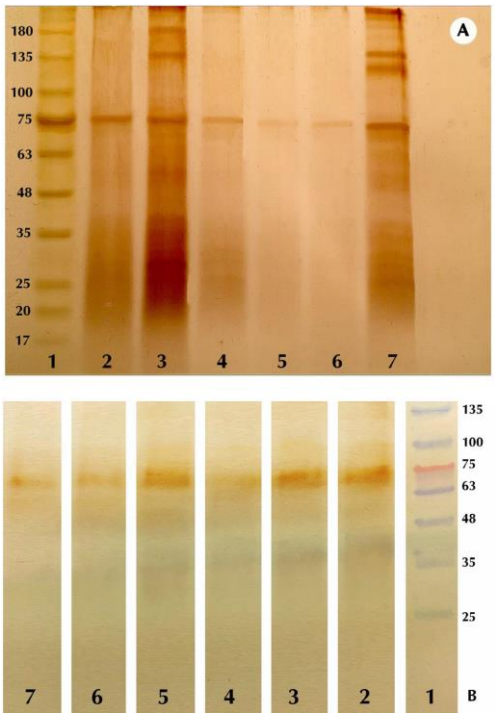
در آزمون وسترن بلات، ۱۹ نمونه مثبت بدست آمد. نتایج بیشتر در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- نتایج وسترن بلات

Table 1. Western blot results

ویژگی (٪)	حساسیت (٪)	منفی	کاذب		مثبت	تعداد	تست
			−	+			
۱۰۰	۹۲/۳۱	۶۲	۱	۰	۱۲	۷۵	وسترن بلات

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



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

مشمشه 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 مشمشه، 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 همین دلیل روش های متنوعی مانند تزریق داخل جلدی پلک پایین در اسب (تست مالئیناسیون)، آزمون CF و الایزا 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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.5.1]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.124]

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 سویه *بورخولدریا مالئی* و جدایه‌های آن، ایجاد نماید.

استفاده از LPS در تست وسترن بلات می‌تواند برای تشخیص آنتی‌بادی ضد *بورخولدریا مالئی* در سرم به کار رود. تست‌های موجود برای تشخیص *بورخولدریا مالئی* 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 مالئی*، 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، مالئیناسیون و تست‌های سرولوژیک برای تشخیص مشمشه و مقایسه آنها با هم به این نتیجه رسیدند که مالئیناسیون حساسیتی در حدود ۷۶٪ و تست CF حساسیتی در حدود ۹۱/۴ درصد را برای تشخیص مشمشه داشت. بقیه تست‌های سرولوژی نیز حساسیتی بالای ۹۰ درصد داشتند. ویژگی تست مالئیناسیون 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 تست های 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 آنتی‌ژن 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 خالص‌سازی پروتئین نوترکیب به عنوان آنتی ژن جدید شدند 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 مالئی* برداشته شود (۱۶).

السچنر 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 مالئیناسیون 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 مالئیناسیون مورد پذیرش OIE، که با کارگیری مالئین PPD است (۶) به‌دلیل وجود برخی دشواری‌ها، تولید این فراورده به صورت آزمایشگاهی محقق شده ولی متاسفانه 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.

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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.5.1]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.124]

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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.5.1]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.124]

Serological Evaluation of Horse Specimens Suspected of Glanders using Western Blot

Nafiseh Shakibamehr[1], Naser Harzandi[2], Nader Mosvari[3] and Naheed Mojgani[4]

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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.5.1]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.124]