Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation of indirect immunofluorescence assay for the diagnosis of bacterial agent of glanders

Shima Jamooli[1], Nader Mosavari[2], Mehdi Asmar[3]

1. Departeman of Microbiology, Faculty of Advance Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Tuberculin and Mallein Production and Research , Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3. Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/09/10
Accepted: 2016/04/15
Available online: 2016/07/16

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2016; 10(3): 01-10

Corresponding author at:

Dr. Nader Mosavari

Department of Tuberculin and Mallein Production and Research, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj. Iran.

Tel: 0989121852329

Email:
n.mosavari@rvsri.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Glanders is one of the most dangerous and oldest communicable zoonotic diseases and causes many deaths in equines, carnivores, and humans. Because of the sudden increase of the rate of glanders in the Middle East and the use of its pathogen as a biological weapon, the detection of this disease is necessary by use of rapid diagnostic tests. This study was conducted to diagnose causative agent of glanders by immunofluorescence method in horses.

Materials and Methods: *Burkholderia mallei* strain was cultured in glycerinated gelose and bouin medium to produce mallein in the Department of Research and production of tuberculin and mallein in Razi Vaccine and Serum Research Institute, then identified using molecular techniques (Such as DNA extraction and PCR). A suspension was prepared and then heated to inactivate the bacteria. A bacterial smear was prepared and fixed on a slide. By injecting the microbial suspension to the horse, an antibody produced which was added to an anti-horse conjugated with fluorescein. The slide was examined using an immunofluorescent microscope.

Results: There were clearly luminous bacilli on the slide with positive serum, but dark bacilli were hardly observable on the slide with negative serum.

Conclusions: The results of observation of prepared slides from the positive and negative serum by ELISA, Malleination and CFT tests are match with the results of the immunofluorescence method and the validity of this method was confirmed. As a result, this method can be used for diagnosis causative agent of glanders.

KeyWords: Glanders, *Burkholderia mallei*, Immunofluorecence

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Jamooli S, Mosavari N, Assmar M. Evaluation of indirect immunofluorescence assay for the diagnosis of bacterial agent of glanders. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (3):1-10

How to cite this article:

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۳ – مرداد و شهریور ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

ارزیابی روش ایمونوفلورسانت غیر مستقیم در تشخیص عامل باکتریایی مشمشه

شیما جمولی[۱]، نادر مصوری[۲]، مهدی آسمار[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم داروئی، تهران، ایران

۲. بخش تحقیق و تهیه توبرکولین و مالئین ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AEREO)، تهران، ایران

۳. گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۰۶/۱۹

پذیرش:۱۳۹۵/۰۱/۲۷

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۵/۳۱

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(3): 01-10

نویسنده مسئول:

دکتر نادر مصوری

بخش تحقیق و تهیه توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۱۸۵۲۳۲۹

پست الکترونیک:

n.mosavari@rvsri.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: مشمشه یکی از خطرناک‌ترین و قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیردار زئونوز در تک سمی‌ها می‌باشد که تاکنون موارد زیادی از تلفات در تک سمیان، گوشت‌خواران و انسان را ایجاد نموده است. افزایش ناگهانی این بیماری در منطقه خاورمیانه و استفاده از عامل این بیماری به‌عنوان یک سلاح بیولوژیک، طراحی و استفاده از تکنیک‌های تشخیصی سریع این بیماری را بسیار ضروری می‌نماید. این مطالعه باهدف تشخیص عامل بیماری مشمشه در اسب با روش ایمونوفلورسانس انجام شد.

مواد و روش کار: سویه تولیدی باکتری *بورخولدریامالئی* مورد استفاده در تولید مالئین بخش تحقیق و تهیه توبرکولین، مالئین و یونین موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در محیط کشت ژلوز و بویون گلیسرینه کشت داده شد و سپس به‌وسیله تکنیک‌های مولکولی (مانند استخراج DNA و PCR) تعیین هویت گردید. در ادامه سوسپانسیون تهیه و توسط حرارت غیرفعال گردید. سپس اسمیر باکتری بر روی لام تهیه و ثابت گردید، با اضافه نمودن پادتن تهیه شده از تزریق سوسپانسیون میکروبی به اسب و آنتی هورس کنژوگه با فلورسئین نشان‌دار، لام به‌وسیله میکروسکوپ ایمنوفلورسنت مشاهده گردید.

یافته‌ها: در لام با سرم مثبت باسیل‌های درخشان با وضوح قابل‌رؤیت می‌باشند، ولی در لام با سرم منفی باسیل‌های تیره به سختی قابل مشاهده بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مشاهده اسلایدهای تهیه گردیده از سرم های مثبت و منفی که توسط تست‌های الیزا، مالیئناسیون و تست ثبوت عناصر مکمل، با نتایج بدست آمده از روش ایمنوفلورسانس، همخوانی دارد و صحت این روش را تائید می‌نمود. در نتیجه این روش می‌تواند جهت تشخیص عامل بیماری مشمشه به کار برود.

کلمات کلیدی: مشمشه، *بورخولدریا مالئی*، ایمنوفلورسنت

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

باکتری مشمشه یکی از خطرناک‌ترین و قدیمی‌ترین بیماری‌های واگیردار زئونوز است که اغلب تک سمیان را مبتلا می‌سازد. عامل این بیماری، باکتری گرم منفی غیر متحرک و بدون اسپور به‌نام *بورخولدریا مالئی* (*Burkholderia mallei*) است. این میکروارگانیسم انگل درون‌سلولی اختیاری می‌باشد که به آسانی با نور، گرما و ضدعفونی‌کننده‌های معمولی از بین می‌رود. اسب‌ها، قاطرها و الاغ‌ها از گونه‌های معمول درگیر هستند. انسان میزبان اتفاقی به این عامل عفونی است و در بیش‌تر موارد، بیماری ناشی از آن منجر به مرگ می‌شود (۱).

سرایت عامل بیماری از طریق مجاری تنفسی فوقانی، پوست و اغلب از راه بلع مواد غذائی آلوده اتفاق می‌افتد که در این زمینه آبش‌خورهای مشترکِ آلوده و حاملان، نقش بسزایی خواهند داشت. گوشت‌خوارانی همانند شیر با خوردن گوشت آلوده به *بورخولدریا مالئی* دچار بیماری می‌شوند. در حال حاضر طبق رفرنس OIE (سازمان بهداشت جهانی حیوانات) روش‌های متنوعی برای تشخیص مشمشه موجود است (۳، ۲).

متأسفانه برای این بیماری واکسن و یا روش پیشگیری وجود ندارد و مهم‌ترین روش‌های مهار بیماری بر پایه شناسایی و

معدوم‌سازی حیوانات آلوده و رعایت شرایط قرنطینه‌ای کامل است. روش تشخیصی روتین در کشور ایران تست مالئین است تست مالئین روش تشخیصی معمول در ایران است که بسیار وقت‌گیر و هزینه‌بر می‌باشد. همچنین این روش تشخیصی وابسته به قضاوت فردی است، به طوری که تشخیص اشتباه موجب افزایش عفونت و به وجود آمدن اپیدمی در منطقه خاصی می‌گردد.

در سال ۱۲۹۸ شمسی، میزان آلودگی و شیوع آن در تعدادی از مناطق ایران از جمله گرگان، آذربایجان، کردستان، لرستان، خوزستان، فارس، تهران و اصفهان بالا بود و آلودگی فقط در کرمان و مکران گزارش نشده بود. (۴). در سال ۱۳۵۲، آخرین آندمی (فراگیری محدود) مشمشه در دزلی کردستان رخ داد. در جریان این همه‌گیری حدود ۲۰۰ رأس اسب تلف و پنج نفر انسان فوت شدند (۵، ۱).

در سال ۱۳۷۷، شکل مخفی مشمشه در اسب‌های مسابقه‌ای جزیره کیش شیوع یافت. در دی‌ماه ۱۳۸۹ در باغ‌وحش پارک ارم تهران یک قلاده ببر آمور نر (وارد شده از روسیه) بر اثر ابتلا به مشمشه تلف شد و به دنبال آن شیرهای باغ‌وحش ارم تهران به علت ظن به مشمشه معدوم شدند. منشأ آلودگی مصرف گوشت تازه الاغ وارداتی از عراق توسط گوشت‌خواران باغ‌وحش اعلام شد که فاقد تست مالئین بودند (۳، ۶).

تشخیص آزمایشگاهی مشمشه به دلیل خطراتی که برای انسان دارد، باید در آزمایشگاه طبق شرایط خاص صورت گیرد. برای بررسی نمونه‌های بالینی یا آلوده کردن جوندگان در آزمایشگاه، تجهیزات و وسایل آزمایشگاه با سطح ایمنی زیستی سه مورد نیاز است (۷).

در شکل حاد بیماری مشمشه جداسازی عامل عفونی از بافت های آلوده صورت می گیرد. مایه مالئین بکار گرفته شده از پادگنی که از کشت باکتری مشمشه در پیرامون بویون گلیسرینه بدست می‌آید گرفته می‌شود که تزریق در حیوان تندرست بی‌ضرر بوده، ولی در حیوانات آلوده (راکتور) سبب تورم و تراوش چرک از گوشه چشم می‌گردد. خوکچه آلوده به شدت دچار التهاب صفاق و پرده‌های بیضه می‌گردد. مشاهده این نشانه‌ها به فاصله ۳-۲ روز بعد از تزریق واکنش اشتراوس (Reaction Straus) نامیده می‌شود (۹، ۸).

تست ثبوت عناصر مکمل دقیق‌ترین روش تشخیص سرم‌شناسی مشمشه است. سرم دام مبتلا پس از یک هفته از ابتلای آن قابل آزمایش می‌باشد و تا مدت طولانی در شکل‌های مزمن بیماری نیز سرم، مثبت باقی می‌ماند. عیار ۱ به ۴۰ به عنوان مثبت تلقی می‌گردد. تست ثبوت عناصر مکمل حدود ۱۲ روز پس از عفونت و در موارد استثنایی پس از ۴ هفته مثبت می‌گردد. ویژگی تست ۹۹ درصد است. در این روش، امکان واکنش متقاطع بین *بورخولدریا مالئی* و *بورخولدریا سودومالئی* نیز وجود دارد (۱۰).

تست ثبوت عناصر مکمل طبق رفرنس OIE دارای ویژگی ۱۰۰٪ و قابلیت اجرایی راحت می‌باشد و به تجهیزات خاصی نیاز ندارد. نتایج این آزمون، در مدت ۲ دقیقه حاصل می‌شود و از طرفی قابلیت اجرایی در شرایط فیلدی را دارد (۱۱).

وسترن بلاتینگ از روش‌های است که برای تشخیص و آنالیز پروتئین‌ها استفاده می‌شود. این روش یک آزمایش تأییدکننده است و در مقایسه با تست الیزا و CFT اختصاصی‌تر می‌باشد، ولی از حساسیت کمتری برخوردار است. وسترن بلاتینگ آزمایشی نسبتاً گران محسوب می‌شود به عنوان اولین آزمایش انجام نمی‌گیرد. این تست بیشتر در تأیید نتایج مثبت شده تست الیزا به کار می‌رود. این روش در سال ۲۰۱۱ توسط Elschner همکارانش برای تشخیص مشمشه استفاده شد (۱۲).

اساس آزمایش‌های مالئین نشان دادن ازدیاد حساسیت تاخیری ناشی از عفونت با *بورخولدریا مالئی* است، به طوری که تزریق آن در حیوانات سالم واکنشی به همراه ندارد، ولی در حیوانات آلوده سبب نشانه‌هایی از قبیل تورم، پرخونی و ترشح چرک از چشم می‌گردد (۱۳).

روش فلورسانس به معنی کسب فلوروکروم یا فلوروفور است که نور را در طول موج خاصی جذب می‌کند. اساس این روش بر مبنای وضوح‌بالا، حساسیت، اختصاصیت و انتخابی بودن است. فلورسانس منبع نور اختصاصی را کسب می‌کند، تصویر آن‌ها معمولاً به وسیله جداکننده‌های پیشرفته الکتریکی نور ضبط می‌شود. روش ایمنوفلورسنت جهت تشخیص بیماری‌های متعددی از جمله، سیاه‌زخم، طاعون، تب کریمه کنگو، هاری، توکسوپلاسموزیس، سندرم داون و بیماری‌های دیگری کاربرد دارد، ولی در مورد بیماری مشمشه سابقه‌ای در دنیا وجود ندارد.

پس از تشخیص مشمشه و جدا کردن نمونه عفونی، برای مشاهده نمونه به وسیله میکروسکوپ فلورسنت بخش‌ها یا مولکول‌های ویژه در داخل سلول با مواد فلورسنت یا نورافشان رنگ‌آمیزی می‌شوند. زمانی که هدف تشخیص پروتئین‌های خاص یا جایگاه آن‌ها در سلول باشد، روش‌های معمول رنگ‌آمیزی که پروتئین‌ها را به طور عام رنگ می‌کنند قابل استفاده نیستند. برای رنگ‌آمیزی اختصاصی، معمولاً از پادتن‌های اختصاصی متصل به مواد فلورسنت استفاده می‌شود (۱۴). در این راستا، از روش ایمنوفلورسانت غیرمستقیم در جهت سرعت بخشیدن برای تشخیص بیماری مشمشه استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری *بورخولدریا مالئی* شامل، سویه اخذ شده از ببر مبتلا به مشمشه در باغ‌وحش پارک ارم تهران، سویه مورد استفاده در تولید مالئین، سویه ۳۲۵ (سویه تزریقی به اسب است که شماره ۳۲۵ مربوط به سویه ای از *بورخولدریا مالئی*است که از شهر استکهلم به شماره ۵۶-۱۲-۱۹ وارد بخش توبرکولین و یونین موسسه رازی شده است)، سویه تزریقی به بیضه راست خوکچه هندی، سویه لیوفیلیزه، سویه *بورخولدیا سودومالئی* (وارداتی از انستیتو پاستور فرانسه به شماره ۱۳۲۶-۱۲-۵)، سویه *سودوموناس ائروژینوزا*، نمونه های حاصل از حیوانات آلوده با رعایت اصول ایمنی سطح سه، در محیط ژلوز و بویون گلیسیرینه کشت داده شدند. بعد از گذشت دو روز کلنی های باکتری رشد کردند. کلنی‌های رشد یافته در لوله‌های آزمایش جداگانه جمع‌آوری شدند (از هر سویه، ۲ لوله). لازم به توضیح می‌باشد که خونگیری از حیوانات حساس شده یک ماه پس از تزریق انجام می‌شود.

در ادامه آنتی‌ژن‌های حاصل از کشت سویه مورد استفاده در تولید مالئین و سویه تزریقی به اسب، به دو گروه a و b تقسیم شدند. باکتری‌های گروه a، در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و باکتری‌های گروه b، در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه طبق دستورالعمل OIE غیر فعال گردیدند.

مرحله آماده سازی آنتی بادی

یک میلی لیتر از سوسپانسیون با استاندارد یک مک فارلند (۳۰۰×۱۰^{۶}) تهیه شده از کشت باکتری های مذکور به همراه ادجوانت ناقص به اسب سالم در سه مرحله به فاصله ۱۴ روز یکبار تزریق شد و سپس میزان آنتی بادی توسط آزمون های الیزا و تست ثبوت عناصر مکمل، مورد بررسی قرار گرفت. از سرم این اسب ها به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای نمونه‌های کنترل منفی نیز از سرم اسب هایی که قبلا توسط روش های مالئیناسیون، الیزا و تست ثبوت عناصر مکمل سلامت آنها تائید گردیده بود، استفاده گردید (۳).

در تست مالیناسیون ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مالئین به زیر پلک حیوان (قسمت بیرونی پلک پایینی به فاصله ۳-۵ میلیمتر از لبه پلک) تزریق می‌شود. با گذشت زمان ۴۸ ساعت از تزریق نتیجه آزمون قرائت می‌شود و تفسیر نتایج صورت می گیرد. عدم مشاهده هرگونه واکنش بعد از ۴۸ ساعت پس از زمان تزریق در پلک مورد عمل و یا مشاهده تورم مختصر با قوام کم در پلک چشم مورد عمل، نتیجه آزمون به عنوان منفی محسوب میشود. در صورت مشاهده تورم نتیجه آزمون به عنوان مثبت اعلام می گردد (۱۵، ۳).

در روش الیزا رقت سریالی از آنتی ژن تهیه شده و در کف پلیت قرار داده می‌شود. در مرحله بعد بافر کد کننده اضافه شده و انکوبه گذاری می‌شود. سپس با استفاده از محلول بافری شستشو داده می‌شود. بعد از افزودن آنتی هورس انکوبه گذاری صورت گرفته و سپس شستشو داده می‌شود. در نهایت بعد از افزودن محلول خاتمه دهنده و انکوبه گذاری نتایج قرائت می گردد (۱۵، ۳).

آزمایش ثبوت عناصر مکمل برای تشخیص مشمشه در بیشتر کشورها به‌کار گرفته می‌شود و از حساسیت بالائی برخوردار است. در این آزمایش سرم موردنظر را به‌مدت نیم ساعت در حرارت ۶۰ درجه سلسیوس گرم و سپس مورد استفاده قرار می‌دهند. پادتن موردنیاز را از کشت میکروب مشمشه تهیه و یا از مالئین استفاده می‌کنند. تیتر حاصل تا یک‌دهم منفی و یک‌بیستم مشکوک و یک‌چهلم مثبت تلقی می‌شود. در ابتدا از آنتی ژن و آنتی بادی رقت سریالی تهیه شده و در پلیت کد می‌شود. به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گذاری می‌شود. در مرحله بعد کمپلمان افزوده شده و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گذاری شده و نتایج قرائت می‌گردد (۱۵، ۳).

شناسایی مولکولی

۳۰۰ میکرولیتر از باکتری کشته شده به میکروتیوب اضافه شد و سانتریفوژ گردید (۱۲۰۰۰ دور ۱۰ دقیقه). مایع رویی خارج شد و مراحل استخراج در مورد رسوب باقی مانده انجام گرفت.

۱۰۰ میکرولیتر لیزوزیم TE1X (تریس-EDTA) اضافه شد. به منظور مخلوط شدن لیزوزیم ورتکس صورت گرفت و در ترموسایکلر ۳۷ درجه سلسیوس ۳۰ دقیقه نگهداری شد. برای ۱۰ نمونه ۱۱۰۰ میکرولیتر SDS و ۱۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K نیاز است. از مخلوط حاصل ۱۱۰ میکرولیتر در هر میکروتیوب اضافه شد و در ادامه میکروتیوب ها را ورتکس گردید و در ترموسایکلر ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر نمک ۵ مولار اضافه گردید و به منظور افزایش ویسکوزیته محلول CTXB(که در دمای ۶۵ درجه ترموسایکلر قرار گرفته بود) اضافه شد.

میکروتیوب ها ورتکس شد تا محلولی شیری رنگ حاصل شود. سپس در دمای ۶۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه ترموسایکلر گردید. ۷۵۰ میکرولیتر ایزوآمیل الکل-کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه شد و به منظور مخلوط شدن مواد آن‌ها ورتکس شدند. سانتریفوژ (۱۲۷۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) انجام گرفت و لایه رویی به میکروتیوب دیگری منتقل شد. در هر میکروتیوب ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. (در این مرحله با تکان دادن میکروتیوب کلاف DNA قابل رویت است). میکروتیوب ها را به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت و سپس در ۱۲۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. با حذف مایع رویی، در هر میکروتیوب ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده شد و دوباره در نمونه در ۱۲۷۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی دوباره خارج شد و پس از گذشت حدود ۲۰-۱۸ ساعت، به میزان ۲۰ میکرولیتر TE1X به هر میکروتیوب اضافه گردید و در ادامه به مدت یک ساعت در ترموسایکلر ۳۷ درجه قرار گرفت.

بر روی DNA استخراجی از باکتری‌های مورد مطالعه، آزمون PCR انجام گرفت. مواد متشکله برای هر آزمون PCR در میکروتیوب های ۰/۵ میلی لیتری ریخته شد و برای جلوگیری از اتلاف زمان بر حسب تعداد نمونه مورد آزمایش یک مخلوط اصلی (Master Mix) تهیه گردید. برای انجام هر واکنش PCR مواد مورد نیاز به شرح زیر با یکدیگر مخلوط شدند. مخلوط تجارتی آماده مصرف PCR؛ ۸ میکرولیتر، پرایمر جلو برنده، ۱ میکرولیتر (۵ پیکومول)، پرایمر پس ران، ۱ میکرولیتر (۵ پیکومول)، آب مقطر دو بار تقطیر ۴ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر DNA مخلوط فوق به میکروتیوب های PCR با تقسیمات ۱۴ میکرولیتری انتقال داده شد (۳).

۲ میکرولیتر از هر DNA استخراج شده به غلظت حدود ۱۰۰ نانوگرم به مخلوط PCR اضافه گردید و حجم نهائی به ۱۶ میکرولیتر رسانیده شد. مخلوط فوق به کمک یک میکروسانتریفوژ در g× ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ ثانیه سانتریفوژ گردید و سپس میکروتیوب ها داخل دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد (۳).

برای کنترل مثبت از DNA استخراج شده سویه *بورخولدریا مالئی* مولد مالئین بخش توبرکولین موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی که قبلاً مثبت بودن آن تائید شده بود، استفاده شد وکنترل منفی، میکروتیوب حاوی تمامی اجزاء میکروتیوب کنترل مثبت و فاقد DNA الگو بود که به جای DNA، آب مقطر اضافه شد. پس از گذشت زمان فوق محصول PCR الکتروفورز گردید (۳).

پرایمر های مورد استفاده برای انجام PCR به شرح زیر می‌باشد:

Bma-IS407-flip forward:
5´-TCA-GGT-TTG-TAT-GTC-GCT-CGG-3´
Bma-IS407-flip-reverse:
5´-CTA-GGT-GAA-GCT-CTG-CGC-GAG-3´

مراحل انجام روش ایمنوفلورسانس در تشخیص مشمشه

گستره ای دایره ای شکل از سوسپانسیون باکتری ها به منظور طراحی اسلاید پادگن تهیه گردید. اسلاید پادگن در دمای اطاق قرار داده شد تا لکه های پادگن کاملاً خشک گردد. بر روی لام میکروسکوپی، لکه‌های پادگن با فیکساتور های مختلف (شامل ۱۰ میکرولیتر اتانول، متانول، استن فریز شده و حرارت) ثابت گردید.

سرم مورد نظر را توسط بافر فسفات (PBS) با pH حدود ۷/۴-۷/۲ در میکروپلیت های U-Shape با رقت های ۱:۲، ۱:۴،

۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ تیترشد. پس از افزودن سرم تیتر شده بر روی لکه‌های پادگن، اسلایدها در اطاقک مرطوب قرار گرفت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد.

مجموعه فوق را دوبار و هر بار به مدت ۷ دقیقه با محلول بافر فسفات به کمک شیکر ملایم شستشو گردید. در ادامه محلول کونژوگه با رقت ۱۰ میکرولیتر بر روی لکه‌های پادگن افزوده شد و همانند مرحله قبل عمل شستشو با محلول بافر فسفات انجام گردید. در نهایت نمونه در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد.

ارزیابی اتصال پادگن-پادتن

برای شناسایی بهترین میزان پادگن-پادتن و شناسایی منطقه هم ارز و عدم تشکیل پیش شبکه و یا پس شبکه، از آزمون های آگلوتیناسیون و ژل دیفیوژن استفاده شد. در تست های آگلوتیناسیون و ژل دیفیوژن رقت های متفاوتی از پادگن و پادتن از ۱/۱۰ تا ۱۰/۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفت و مناسب ترین رقت به منظور اتصال مناسب پادگن به پادتن مشخص گردید.

به منظور ارزیابی میزان آنتی هورس مورد استفاده از تست های الیزا، آسکولی و تست ثبوت عناصر مکمل استفاده گردید. پس از اتصال پادگن به پادتن در روش ایمنوفلورسانس، در مرحله بعد، آنتی هورس به کمپلکس فوق اتصال می یابد. به منظور تعیین رقت مناسب جهت اتصال آنتی هورس کونژوگه به کمپلکس پادگن-پادتن رقت های متفاوتی از ۱/۲ تا ۱/۱۲۸ مورد بررسی قرار گرفت.

با احتمال تأثیر تغییر زمان شستشو بر کیفیت نتایج، زمان شستشو از ۳۰ ثانیه تا ۷ دقیقه تغییر داده شد. با احتمال تغییر محلول شستشو دهنده بر کیفیت نتایج، آب مقطر، سرم فیزیولوژی و بافر فسفات به عنوان محلول شستشو دهنده استفاده شدند.

حساسیت و اختصاصیت تست به منظور کنترل روش طراحی شده مورد بررسی قرار گرفت، برای این منظور حساسیت تست با تهیه رقت های متفاوت سنجش شد. اختصاصیت تست نیز با باکتری *بورخولدریا مالئی* و همچنین باکتری های دیگری نظیر *بورخولدریا سودومالئی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان پادگن تعیین گردید.

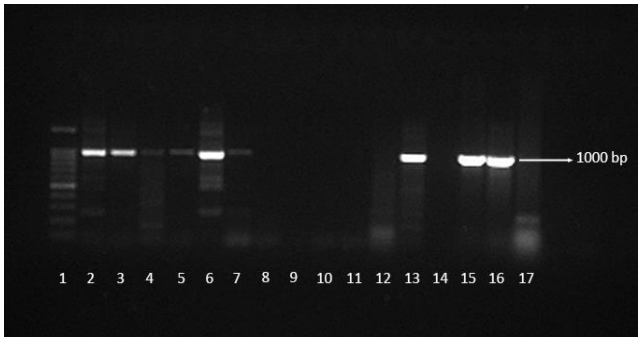
جدول ۱: آزمون های مختلف جهت ارزیابی اتصال پادگن-پادتن

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
مالیناسیون	+	+	+	+	_	_	+	+
الیزا	+	+	+	+	_	_	+	+
CF	+	+	+	+	_	_	+	+
فلورسانس	+	+	+	+	_	_	+	+
ژل دیفیوژن	_	_	_	_	_	_	+	+

۱. سویه اخذ شده از ببر مبتلا به مشمشه در باغوحش پارک ارم تهران، ۲. سویه مورد استفاده در تولید مالئین، سویه ۳۲۵ (سویه تزریقی به اسب است که شماره ۳۲۵ مربوط به سویه از *بورخولدریا مالئی* است که ازشهر استکهلم به شماره ۵۶-۱۲-۱۹ وارد بخش توبرکولین و یونین موسسه رازی شده است)، ۳. سویه تزریقی به بیضه راست خوکچه هندی، ۴. سویه لیوفیلیزه، ۵. سویه *بورخولدیا سودومالئی* (وارداتی از انستیتوپاستور فرانسه به شماره ۱۳۲۶-۱۲-۵)، ۶. سویه*سودوموناس ائروژینوزا*، ۷. نمونه حیوان آلوده شماره ۱. ۸. نمونه حیوان آلوده شماره ۲.

یافته‌ها

روش PCR ماهیت باکتری مورد استفاده در پژوهش را تایید کرد (شکل ۱) و مشخص شد که استون خالص در فریزر نگهداری شده بهترین فیکساتور جهت ثابت کردن نمونه باکتری بر روی لام می‌باشد.در طی فرایند ایمنوفلورسنت غیرمستقیم، مشخص گردید که زمان ۷ دقیقه ای برای شستشو در وضوح رویت باکتری‌های فلورسانس نسبت به دیگر زمان‌های شستشو بهتر است و در این زمان وضوح بهتری مشاهده گردید. سرم فیزیولوژی به دلیل رسوب نمک بر روی باکتری درخشندگی رنگ فلورسین را کاهش می‌دهد و به همین دلیل سرم فیزیولوژی و آب مقطر محلول مناسبی جهت شستشو نیستند. مناسب ترین محلول جهت شستشو بافر فسفات می‌باشد.

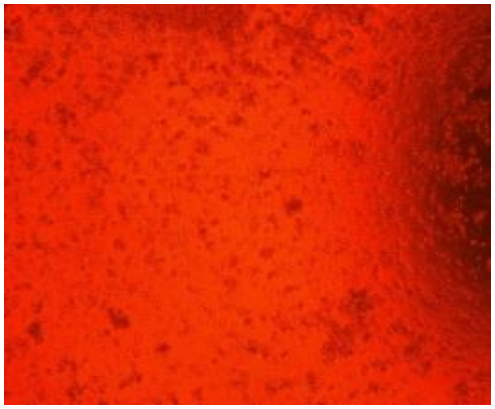


شکل ۱: نتیجه تعیین هویت باکتری مورد استفاده در پژوهش با استفاده از PCR:۱. لدر ۲. سویه اخذ شده از ببر مبتلا به مشمشه در باغوحش پارک ارم تهران غیرفعال شده در ۷۰ درجه، ۳. سویه مورد استفاده در تولید مالئین، سویه ۳۲۵ (سویه تزریقی به اسب است که شماره ۳۲۵ مربوط به سویه ای از بورخولدریا مالئی است که ازشهر استکهلم به شماره ۵۶-۱۲-۱۹ وارد بخش توبرکولین و یونین موسسه رازی شده است) غیرفعال شده در ۷۰ درجه، ۴. سویه تزریقی به بیضه راست خوکچه هندی غیرفعال شده در ۷۰ درجه، ۵. سویه لیوفیلیزه غیر فعال شده در ۷۰ درجه، ۶. نمونه حیوان آلوده غیرفعال شده در ۷۰ درجه، ۷. نمونه حیوان آلوده، ۸. سویه *بورخولدیا سودومالئی* (وارداتی از انستیتوپاستور فرانسه به شماره ۱۳۲۶-۱۲-۵)، ۹. سویه *سودوموناس ائروژینوزا*،۱۰. کنترل منفی، ۱۱. کنترل منفی، ۱۲. سویه اخذ شده از ببر مبتلا به مشمشه در باغوحش پارک ارم تهران غیرفعال شده در ۹۰ درجه، ۱۳. سویه مورد استفاده در تولید مالئین، سویه ۳۲۵ (سویه تزریقی به اسب است که شماره ۳۲۵ مربوط به سوشی از *بورخولدریا مالئی*است که ازشهر استکهلم به شماره ۵۶-۱۲-۱۹ وارد بخش توبرکولین و یونین موسسه رازی شده است) غیرفعال شده در ۹۰ درجه، ۱۴. سویه تزریقی به بیضه راست خوکچه هندی غیرفعال شده در ۹۰ درجه، ۱۵. سویه لیوفیلیزه غیر فعال شده در ۹۰ درجه، ۱۷. کنترل منفی.

با ارزیابی اتصال پادگن به پادتن و اتصال این مجموعه به آنتی هورس کونژوگه با فلورسئین مشخص شد که ایجاد شرایط مرطوب موجب اتصال بهتر پادگن به پادتن و در نهایت اتصال آنها به آنتی هورس کونژوگه با فلورسین می‌شود.

با مشاهده باسیل درخشان، نتیجه می گیریم، حرارتی که برای غیرفعال نمودن باکتری استفاده شد، بر تخریب آنتی ژن و تغییر فرم دیواره آن تأثیری نداشت و رنگ فلورسئین موجود در آنتی هورس به دیواره باکتری متصل گردید (شکل ۲).

با بررسی لام های تهیه شده با سرم مثبت، باکتری های فلورسانس بصورت درخشان و به وضوح مشاهده گردید (شکل ۳)، ولی در لام های که توسط سرم منفی تهیه شده بود، باکتری ها فلورسانس نیستند و باکتری های تیره، غیرفلورسانس و به سختی قابل رؤیت بود (شکل ۴).



شکل ۲: اثر حرارت در غیرفعال سازی باکتری مورد بررسی قرارگرفت و مشخص شد تغییر درجه حرارت در غیرفعال سازی باکتری *بورخولدریا مالئی* تاثیری در شکل ظاهری نداشته و دیواره باکتری به منظور اتصال رنگ فلورسانت بدون تغییر باقی مانده است.

با مشاهده لام های سرم های مثبت و منفی بدست آمده از فیلد، که توسط تست های الیزا، مالیئناسیون و تست ثبوت عناصر مکمل که قبلاً تأیید شده بود، همخوانی و صحت روش ایمنوفلورسانس را با این روش ها تأیید می نماید. با توجه به تعداد نمونه های کار شده درصد حساسیت و دقت تست با مقایسه با الیزا و مالئیناسیون و کشت در یک مرتبه بود و حساسیت آن در حد حساسیت ۹۸ درصد الیزا می‌باشد.

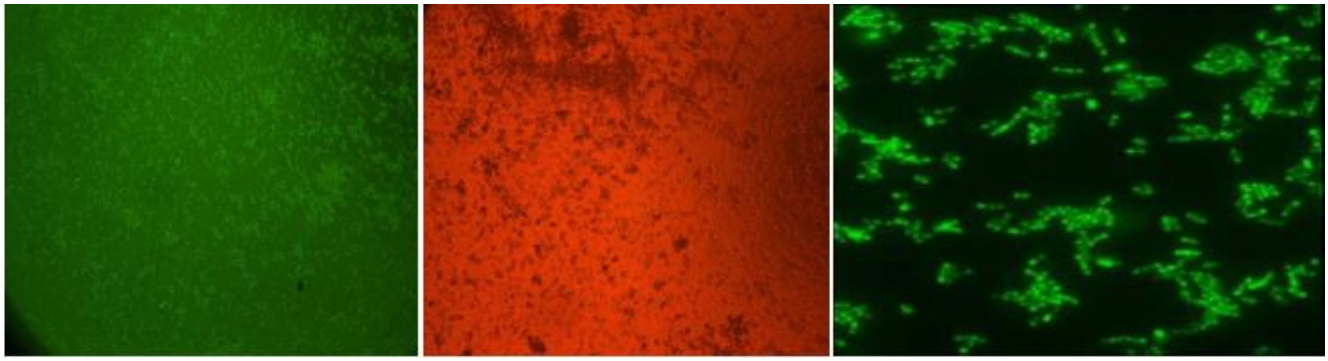
حساسیت پادتن به رقت های ۱/۳۲ و ۱/۶۴ مورد شناسایی قرار گرفت و پادتن تنها برای باکتری*بورخولدریا مالئی* اختصاصی بود و سایر باکتری ها نظیر *بورخولدریا سودومالئی* و *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی نشدند.

بحث

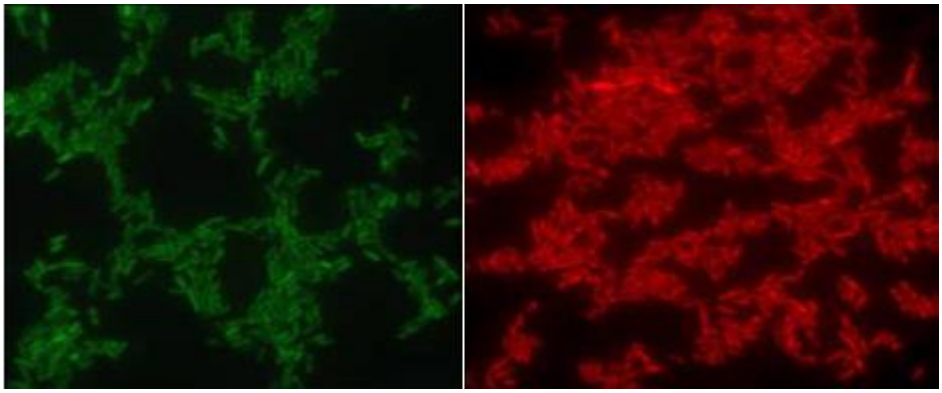
اهمیت تشخیص سریع بیماری مشمشه بدلیل افزایش ناگهانی این بیماری در منطقه خاورمیانه و شیوع آن در ایران از یکسو و احتمال ورود عامل این بیماری از کشورهای همسایه با ورود تک سمی‌های غیر مجاز به ایران از طرف دیگر و همچنین اهمیت ویژه *بورخولدریا مالئی*، از نظر قابلیت استفاده از آن به عنوان یک سلاح بیولوژیک بیش از پیش مورد نیاز می‌باشد (۱۶).

همچنین با عنایت به اینکه تاکنون واکسن مناسبی جهت پیشگیری از این بیماری تولید نشده و در صورت تاخیر در تشخیص، حتی با درمان‌های توصیه شده، میزان تلفات این بیماری تا ۵۰٪ و بدون درمان تا ۹۵٪ گزارش شده است، لذا لزوم تشخیص سریع را بدلیل جلوگیری از مرگ و میر، دو چندان است (۱۷).

با توجه به تحقیقات صورت گرفته مشخص شد که هیچ گونه سابقه ای در زمینه تشخیص مشمشه به روش ایمنوفلورسانت غیرمستقیم وجود ندارد و از طرف آزمایشگاه رفرنس مشمشه در آلمان نیز تایید گردید. از طرفی با توجه به درخواست های مکرر وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی و سازمان دامپزشکی کشور در ارتباط با طراحی روشی سریع جهت تشخیص مشمشه پژوهش حاضر صورت گرفت. به دلیل عدم وجود سابقه ای در مورد روش مذکور، این روش با سایر روش های تشخیصی مشمشه مورد مقایسه قرار گرفت. روش‌های مورد تایید متعددی جهت تشخیص مشمشه وجود دارد که روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم با آن‌ها مقایسه می‌شود.



شکل ۳: *بورخولدریا مالئی*فلورسانت با استفاده از سرم مثبت (سرم حیوان آلوده به *بورخولدریا مالئی*) (از سرم حیوان آلوده به *بورخولدریا مالئی* به عنوان آنتی بادی استفاده شده است).



شکل ۴: *بورخولدریا مالئی* غیر فلورسنت با سرم منفی (سرم حیوان سالم نسبت به باکتری *بورخولدریا مالئی*)(از سرم حیوان سالم در برابر باکتری *بورخورلدریا مالئی*، *بورخورلدریا سودومالئی*و *سودوموناس آیروژینوزا* به عنوان آنتی بادی استفاده شده است.)

کشت و تعیین هویت باکتری قطعی ترین روش مورد قبول تمام مجامع علمی و محققان صاحب نظر است، ولی کشت باکتری زمانی امکان پذیر است که اسب به مرحله بیماری رسیده و باکتری را دفع می‌نماید، ولی با استفاده از روش های ایمونولوژیک می‌توان حیوان عفونی را بسیار سریع تر از رسیدن به مرحله بیماری شناسایی نمود. از طرفی دیگر کشت عامل بیماری نیاز به کارشناس و متخصص ورزیده و سطح بالای ایمنی نیاز داشته و زمان مورد نیاز جهت کشت و تعیین هویت باکتری

حداقل ۴۸ ساعت می‌باشد (۱۰، ۳) قضاوت تست مالئین وابسته به فرد است و احتمال اشتباه وجود دارد.

روش های مولکولی مانند PCR زمان بر و نیاز به صرف هزینه بالا می‌باشد (۱۹). روش تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی تنها در مورد نمونه‌های کلینیکی کاربرد دارد. این روش نیاز به صرف زمان و هزینه زیادی است. مهارت نیروی انسانی در پاسخ دریافتی از این تست دارای اهمیت به سزایی می‌باشد. حضور حیوان در این تست مخاطرات متعددی را برای نیروی انسانی در بر دارد.

تست ثبوت عناصر مکمل در حال حاضر مورد تایید ترین روش جهت تشخیص مشمشه است و با گذشت یک هفته از عفونت این تست کارآیی دارد. این روش نسبت به بقیه روش‌های مورد استفاده دارای ارزش تشخیصی بیشتری است. پاسخ دریافتی از این تست ارتباط مستقیم با مهارت نیروی انسانی دارد. طراحی و استاندارد نمودن آن در هر آزمایشگاهی امکان پذیر نمی‌باشد به نحوی که در حال حاضر تنها یک مرکز و یک آزمایشگاه در ایران موفق به انجام آن شده است و از طرفی دیگر این آزمایش نیاز به مواد مصرفی تازه و قابل اطمینان دارد و زمان مورد نیاز برای یک جواب قابل قبول در حدود یک روز بطول می‌انجامد. این در حالی است که در مرزهای کشور برای نقل و انتقال تک سمیان امکان انجام روش مذبور موجود نیست.

وسترن بلات اهمیت زیادی در تشخیص عامل بیماری مشمشه دارد، ولی در حال حاضر به دلیل نیاز به استاندارد سازی آن، در تمام مراکز تشخیصی دنیا انجام پذیر نیست و تنها در آزمایشگاه رفرنس مشمشه واقع در آلمان انجام می پذیرد (۲۰). از طرفی دیگر محدودیت های ذکر شده قبلی مانند صرف هزینه بالا، نیاز به آزمایشگاه مجهز و متخصصین ورزیده و زمان را مطابق با دیگر روش ها دارا می‌باشد و نمی توان از آن جهت غربالگری و در زمان کوتاه استفاده نمود (۲۰).

تست رز بنگال به منظور تشخیص اسب آلوده و دیگر حیوانات حساس در روسیه پایه گذاری شد و بعد از آن در پاکستان مورد بررسی قرار گرفت. تست رزبنگال در پلیت آگلوتیناسیون انجام می‌شود. این تست نیز دارای معایبی می‌باشد، در اسب مبتلا به مشمشه مزمن پاسخ منفی کاذب در این تست مشاهده می‌شود. این روش در حال حاضر در تمام دنیا کاربرد ندارد (۱۹).

تست مالئین روش روتین کشور ایران است. این روش در مناطق آندمیک کاربرد دارد. دارای بیشترین میزان حساسیت نسبت به سایر روش‌های تشخیصی است. انجام این تست به زمان طولانی نیاز دارد. بالا بودن هزینه و احتمال آلودگی نیروی انسانی نیز از معایب این تست می‌باشد. به دلیل تزریق به داخل جلد پلک پایین حیوان مورد آزمایش مورد استقبال صاحبان اسب ها نبوده و بیشتر اسب داران تقاضای جایگزین نمودن آنرا با تست ثبوت عناصر مکمل دارند از اینرو OIE نیز اولویت آنرا در چاپ جدید از اولین تست تشخیصی به چهارمین تست تنزل داده است (۱).

پژوهش دیگری در مورد تشخیص مشمشه صورت گرفته است که در این تحقیق پروب به منظور تشخیص باکتری طراحی شده است، این روش نیز نسبت به روش ایمنوفلورسانس نیاز به صرف زمان و هزینه بیشتری دارد (۲۰).لذا با توجه به تمام موارد ذکر شده و با توجه به درخواست های مکرر سازمان دامپزشکی کشور و وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی جهت طراحی یک آزمون سرولوژی تشخیصی، تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم بدلیل سهولت انجام و عدم نیاز به متخصص مجرب و سرعت تشخیصی بالا، برای غربالگری تک سمیان پیشنهاد می گردد و بهتر است تا از این آزمایش در تمامی مکان هایی که می بایستی سریع قضاوت نمود، استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از اعضای محترم بخش توبرکولین، یونین و مالئین موسسه واکسن و سرم سازی رازی وجناب آقای دکتر رحمتی هولاسو در بخش بیماری ماهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به دلیل همکاری صمیمانه در تهیه تصاویر فلورسنت در این پژوهش کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Whitlock GC, Estes DM, Torres AG. Glanders: off to the races with Burkholderia mallei. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 277 (2): 115–22.

2. Khaki P, Mosavari N, KhajehNasiri S, Emam M, Ahouran M, Hashemi S, et al.Glanders outbreak at Tehran Zoo, Iran. Iran J Med Microbiol. 2012; 4 (1): 3-7.

3. Vallat B, Caporale V. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 17nd ed. World Organisation for Animal Health (OIE); 2012; 2; Chapter 2.5.11. 913-20.

4. Schell MA, Ulrich RL, Ribot WJ, Brueggemann EE, Hines HB, Chen D, et al. Type VI secretion is amajor virulence determinant in *Burkholderia mallei*. Mol Microbiol. 2007; 64(6): 1466-85.

5. Tadjbakhsh H. Traditional methods used for controlling animal diseases in Iran. Rev Sci Tech. 1994; 13(2): 599-614.

6. Whitlock GC, Mark Estes D, Torres AG. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. FEMS Microbiol Lett. 2007; 277(2): 115-22.

7. Tajik A, Kazaemi A. The role of medical laboratory in diagnosis of NBC war lesions injuries.NEZAJA publication. 1nd ed; 2007: 89-94.

8. Lever MS, Nelson M, Ireland PI, Stagg AJ, Beedham RJ, Hall GA, et al. Experimentalaerogenic *Burkholderia mallei* (glanders) infection in the BALB/c mouse. J Med Microbiol. 2003; 52(12): 1109-15.

9. Blaha T. Applied Veterinary Epidemiology. 1nd ed. Tehran: Aeejh press; 1997.

10. Naureen A, Saqib M, Muhammad G, Hussain MH, Asi MN. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. J Vet Diagn Invest. 2007; 19(4): 362-7.

11. Herr S, huchzermayer HF, Tebrugge LA, Williamson CC, Roos JA, Schiele GJ. The use of a single complement fixation technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmosis and Q fever serology. Onderstepoort J Vet Res. 1985; 52: 279-82.

12. Elschner MC, Scholz HC, Melzer F, Saqib M, Marten P, Rassbach A, et al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. BMC vet res. 2011; 7(4): 1-6.

13. Van Zandt KE, Greer MT, Gelhaus HC. Glanders: an overview of infection in humans. Orphanet J Rare Dis. 2013; 8: 131-137.

14. Alibasoglu M, Yesildere T, Calislar T, Inal T, Calsikan U. Glanders outbreak in lions in the Istanbul zoological garden. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1986; 99: 57-63.

15. Naureen A, Saqib M, Ghulan M, Hussain MH, Asi MN. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. J Vet Diagn Invest. 2007; 19: 362-367.

16. Al-Ani FK, Roberson J. Glanders in horses: A review of the literature. Vet Arh. 2007; 77(3): 203-18

17. Akbarein H, Bahonar AR, Dabbagh Moghaddam A, Bolouki Z, Shokouh H. Glanders, A New Vision on an Old Biological Weapon. HBI J. 2012, 10(2): 143-62

18. Tkachenko GA, Antonov VA, Zamaraev VS, Iliukhin VI. Identification of the causative agents of glanders and melioidosis by polymerase chain reaction. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 2003;(3): 18-22.

19. Filho MBC, Ramos RM, Fonseca AA, Orzil LL, Sales ML, Santana VLA , et al. Development and validation of a method for purification of mallein for the diagnosis of glanders in equines. BMC Vet Res. 2012; 8:154-63.

20. Poppert S, Elschner M, Tannich E, Vergenes LM, Hagen R. Identification of *Burkholderia Pseudomallei* and *B.malleiby* Fluorescence in situe Hybridization. Int J Med Microbiol. 2011; 301(7): 585-90.