DOI: 10.22092/VJ.2018.116553.1399
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

استفاده از آزمون رز بنگال برای شناسایی مشمشه در اسب‌ها

• **امین کریمی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران
• **نادر مصوری(نویسنده مسئول)**
آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماریزای دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۷-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۴-۱۰-۱۳۹۶
Emali: nmosavari@gmail

چکیده

مشمشه بیماری عفونی است که توسط باکتری بورخولدریا مالئی ایجاد می‌گردد. مشمشه عمدتاً در اسب‌ها عارضه ایجاد می‌کند، اما گونه‌های دیگر، از جمله انسان، ممکن است میزبان اتفاقی آن باشند. آزمون آلرژیک مالئین، آزمون معتبر و رایج کشور است که برای تشخیص مشمشه استفاده می‌شود. تست مالئین به کارشناسی ورزیده و ۴۸ ساعت زمان نیاز دارد. لذا برایتشخیص سریع بیماری به ویژه در مرزهای کشوذ که نمی‌توان حیوان را نگهداری نمود، باید از روشهای جدید برای شناسایی بیماری بهره جست. هدف از این مطالعه طراحی آزمون رز بنگال (RBT) برای تشخیص سریع مشمشه است. تعداد ۷۰ نمونه سرم از موارد کشت مثبت، ۳ نمونه سرم از اسب‌هایی که با تزریق آنتی‌ژن حساس شده بودند و ۱۱۰ اسب سالم آزمایش شد. سویه تولیدی باکتری بورخولدریا مالئی مورد استفاده در تولید مالئین در محیط نوترینت گلیسرینه کشت داده شد. جهت اطمینان از وجود باکتری و تعیین هویت آن PCR انجام گرفت. برای انجام RBT، پادگن از بورخولدریا مالئی تهیه شد و سرم‌ها به پادگن رزبنگال اضافه گردید و سرم‌های مثبت و منفی به منظور صحت عملکرد تست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با انجام PCR، باند مشخصه باکتری در محدوده ۲۵۰ جفت باز مشاهده شد. با بررسی سرم‌های مثبت و منفی با استفاده از RBT، پاسخ صریح مثبت یا منفی بدست آمد. با طراحی و اجرای این تست، می‌توان اظهار داشت که این آزمون برای شناسایی سریع مشمشه با ویژگی‌هایی مانند قابلیت اجرایی آسان و عدم نیاز به لوازم تخصصی و پرسنل آموزش دیده، موفقیت آمیز بوده است.

کلمات کلیدی: مشمشه، بورخولدریا مالئی، رزبنگال، اسب

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 59-65

Use of a Rose Bengal test for diagnosis of Glanders in equines

By: Karimi, A., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Karaj, Iran. and Mosavari, N., (Corresponding Author) Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 2017-12-08 **Accepted: 2018-01-14**

Email: nmosavari@gmail

Glanders is an infectious disease that is caused by the bacterium *Burkholderia mallei*. Glanders occurs primarily in equines, but other species, including humans, may become incidental hosts. The allergic test of mallein is a valid and usual test in Iran which is used for the diagnosis of Glanders. The mallein test requires an experienced laboratory person and lasts 48 hours. Therefore in order to quickly diagnose the disease, especially in borders of country, where animals cannot be kept for longtime, new method should be used to identify the disease. To improve identification, in terms of sensitivity and specificity, new methods are needed to identify the disease. The aim of this study is designing of Rose Bengal test (RBT) for diagnosis of Glanders. Sera from 70 naturally infected culture-positive, 3 equines that were sensitized by injecting antigen and 110 healthy equines were tested. *Burkholderia mallei* strain to produce mallein was cultured in glycerinated nutrient medium. To ensure the presence of the bacterium and determine the identity of the PCR were performed. Antigen for RBT was prepared from *Burkholderia mallei* and serums were added to Rose bengal antigen. Finally positive and negative serums were analyzed for confirming the accuracy of the test. By performing PCR, the bacteria characteristic band was observed in the range of 250 bp. By examining positive and negative serums using RBT, positive or negative answer was obtained explicitly. By designing and performing this test, it can be consider, this test has been using for Rapid detection of Glanders with features such as, ease of use and can be applicable without specialized equipment and trained personnel.

Key words: Glanders, *Burkholderia mallei*, Rose Bengal, horse

مقدمه

مشمشه که اولین بار توسط بقراط شرح داده شد، مدت زمان طولانی است که به عنوان خطر شغلی برای مربیان اسب، دامپزشکان، قصابان و کارکنان آزمایشگاه‌ها مطرح است. این بیماری همراه با باسیل شاربن به عنوان اولین سلاح میکروبی به صورت پیشرفته در جریان جنگ جهانی اول به کار گرفته شد (۱ و ۲).

مشمشه بیماری باکتریایی واگیردار و خطرناکی است که بیشتر در تک سمی‌ها مشاهده می‌گردد. این بیماری بسیار کشنده و مشترک بین انسان و دام است. عامل بیماری، باکتری بنام بورخولدریا مالئی است که در سال‌های اخیر محققین به دنبال بالا بردن سطح دانش همه‌گیر شناسی با استفاده از تکنیک‌ها و ابزارهای مدرن مولکولی برای شناسایی و جست‌وجو سویه‌های این باکتری پرداخته اند (۳ و ۴).

جهت مبارزه با این بیماری و کنترل دقیق و ریشه‌کنی آن، شناسایی و وضعیت پراکنش جغرافیای عامل بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. طی دهه اخیر، به علت نابسامانی کشورهای همسایه ایران، کشور ما را در معرض خطر جدی از لحاظ ورود بیماری های خطرناک از جمله مشمشه، از طریق مرزها قرار داده است. همچنین به علت اینکه اطلاعات جامع و کاملی در خصوص میزان های شیوع و بروز مشمشه وجود ندارد و تنها گزارش‌های پراکنده‌ای در خصوص یافتن کانون‌های تك بیماری ثبت شده است، اهمیت شناسایی عامل این بیماری را دو چندان کرده است.

ریشه‌کنی این بیماری با قرنطینه کردن و سایر روش‌های مهاری (از جمله کشتار) در بیشتر کشورها انجام می‌شود (۵). بطور کلی در بیشتر مناطق شناسایی تك سمی‌های حامل باکتری از طریق انجام مالئیناسیون صورت می‌پذیرد و کیت‌های شناسایی تست‌های بیوشیمیایی تجاری و ... فاقد حساسیت تشخیصی می‌باشند (۶). در سال های اخیر به دلیل افزایش شیوع مشمشه، شناسایی عامل آن اهمیت زیادی پیدا کرده است و لذا به کارگیری روش‌های نوین و سریع (مانند تست رز بنگال) جهت شناسایی حائز اهمیت است. در این تحقیق برای اولین بار در ایران تکنیك سرولوژیک رز بنگال به منظور شناسایی مشمشه با استفاده از باکتری بورخولدریا مالئی، طراحی و تولید گردید.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری

سویه مرجع بورخولدریا مالئی مورد استفاده در مجموعه میکروبی بخش توبرکولین موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شامل سویه تولیدی Razi ۳۲۵ و با شماره شناسایی RTCC:۲۳۷۵ استفاده شد.

سرم اسب‌ها

تعداد ۷۰ عدد از نمونه‌های سرم از مواردی که به صورت بالینی و سرولوژی و تست مالئیناسیون مثبت گزارش شده بودند، تعداد ۱۱۰ عدد سرم از اسب‌های سالم جهت کنترل منفی و تعداد ۳ عدد سرم از اسب‌هایی که با تزریق آنتی‌ژن حساس شده بودند، جهت استفاده به عنوان کنترل مثبت، جمع‌آوری شد.

کشت و تست‌های بیوشیمیایی و PCR

از بذر باکتری، به وسیله سرم فیزیولوژی سوسپانسیون تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به وسیله پیپتاژ بر روی محیط نوترینت گلیسیرینه، در زیر لامینار کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند.

پرگنه‌های شاخص بورخولدریا مالئی از طریق رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، آزمون اندول غربال شدند که تشخیص احتمالی جرم به عنوان بورخولدریا مالئی در صورت وجود اجرام میله‌ای شکل با رنگ‌آمیزی نامنظم و قطبی بودن اجرام، کاتالاز مثبت، اندول منفی صورت گرفت. سپس باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط‌های افتراقی شامل، TSI، SIM و Motility کشت داده شد و همچنین برای تایید نتایج از کیت API20 E نیز به طور هم ارز استفاده گردید. نتایج بعد از گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، تجزیه و تحلیل شد.

به منظور فراهم نمودن ماده ژنتیکی باکتری با کیفیت مناسب و قابل استفاده در آزمون PCR، از تمام جدایه‌های کشته شده مورد مطالعه، استخراج ماده ژنتیکی به روش ایزو آمیل الکل-کلروفرم صورت گرفت (۷). کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین گردید و ۲ میکرولیتر از DNA برای انجام واکنش PCR استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده طراحی شدند (جدول ۱) و در ادامه با انجام PCR در شرایط دمائی و تعداد سیکل های مشخص (جداول ۲ و ۳)، وجود نشانگر ژنتیکی BimA در ژنوم باکتری هدف، مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده سازی پادگن برای تست رز بنگال

خوشه‌های سویه بورخولدریا مالئی از نظر خلوص کنترل شدند و در محلول نمکی بافر فسفات (PBS، pH ۶/۴) استریل به صورت تعلیق در آمده و به عنوان لایه‌های بذر در آگار گلیسرول دکستروز در بالن‌های روکس استفاده شدند. بالن‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یك هفته انکوبه شد و رنگ آمیزی هر بالن برای کنترل خلوص انجام شد و سپس کشت‌ها با افزودن ۱۰۰ میلی‌لیتر فنل سالین (۰/۵ درصد فنل در ۰/۸۵ درصد محلول کلرید سدیم) به هر بالن برداشت شدند. بالن‌ها به آرامی تکان داده شده، تعلیق ریخته شد و اجرام در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد

جدول ۱- جزئیات پرایمرهای مورد استفاده در تعیین هویت مولکولی

توالی پرایمرها (´۵-´۳)	ژن	گونه هدف	پرایمر
TTCGATCGATTCCTGCTATC	BimA	*B. mallei*	BimA
GCGTTAAACGCCGTACTTTC	BimA	*B. mallei*	BimA

جدول ۲- جزئیات واکنش‌های PCR مورد استفاده در تعیین هویت مولکولی

حجم نهایی (µl)	آب (µl)	DNA الگو (µl)	پرایمر بالادست (۵pmol/µl)	پرایمر فرودست (۵pmol/ µl)	مستر میکس (µl)	نشانگر
۱۶	۵/۷	۱/۵	۰/۴	۰/۴	۸	**BimA**

جدول ۳- جزئیات شرایط اجرای واکنش های PCR بکار رفته برای تعیین هویت مولکولی

تعداد چرخه ها	دمای نهایی طویل سازی min / ° C	دمای طویل شدن min / ° C	دمای جفت شدن sec / ° C	دمای واسرشت سازی sec / ° C	دمای واسرشت سازی اولیه min / ° C	نشانگر
۳۰	۷۲/۷	۷۲/۱	۶۵/۳۰	۹۴/۳۰	۹۴/۵	**BimA**

در بن ماری جوش کشته شدند. سپس برای اطمینان از غیرفعال شدن باکتری، سوسپانسیون باکتری در محیط آگار خوندار کشت داده شد. غلظت سلول‌های باکتری به روش اسپکتروفتومتری به میزان ۶۵×۱۰^{۹} جرم در میلی‌لیتر تنظیم گردید. رسوب حاصله دوباره در بافر NaOH-لاکتیك اسید (۵۰ میلی مولار، pH ۳/۵) به صورت تعلیق درآورده شد. در مرحله نهایی پادگن‌های بدست آمده (۳۵ میلی لیتر) به وسیله رنگ رز بنگال ۱ درصد (یك میلی لیتر) رنگ آمیزی شدند و در بافر ثانویه دوباره سوسپانسیون شدند.

برای انجام تست رزبنگال، یك قطره (۵۰ میکرولیتر) سرم به یك قطره پادگن رزبنگال (۵۰ میکرو لیتر) در یکی از چاهک‌های پلیت آگلوتیناسیون اضافه گردید و سپس به وسیله اپلیکاتور با یکدیگر مخلوط شدند. پلیت به مدت ۳ دقیقه تکان داده شد و سپس نتیجه مشاهده و بررسی شد (۸).

برای نحوه قرائت و بررسی تست حالت‌های مختلفی در نظر گرفته شد:

۱- ++++ (+۴): آگلوتیناسیون با ظاهر شدن تجمع هایی (لخته) به رنگ رز به وضوح کامل مخلوط (۱۰۰ درصد)؛

۲- +++ (+۳): تجمع های کمی کوچکتر با وضوح ناقص مخلوط (تقریباً ۷۵ درصد)؛

۳- ++ (+۲): تجمع های کوچك با وضوح تقریبی مخلوط (۵۰ درصد)؛

۴- + (+۱): آگلوتیناسیون های دانه ای با وضوح ناچیز در مخلوط (تقریبا ۲۵ درصد)؛

۵- - (منفی): بدون آگلوتیناسیون مخلوط هموژن است و به صورت مساوی در آن پراکنده می‌شود.

در حضور تجمع‌های کوچك یا بزرگ رنگ شده به رنگ رز (صورتی) با وضوح ۵۰ درصد تا ۱۰۰ درصد مایع زیرین واکنش (++ الی ++++)، پاسخ تست به صورت مثبت گزارش شد و اگر کمتر از ++ باشد منفی گزارش گردید.

تحلیل داده‌ها

حساسیت و ویژگی هر آزمون با استفاده از معیار واکنش‌دهنده‌های مثبت و منفی واقعی ارزیابی شد. فرمول محاسبه حساسیت و ویژگی آزمون‌ها بدین شرح بود:

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

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

نتایج

پس از انجام گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های رشد کرده باکتری به صورت کلنی‌های سفید شیری رنگ در تمامی سطح محیط کشت گسترده بودند (شکل ۱).

پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های غیرمتحرك، آرژنین منفی و ژلاتین مثبت جدا شده، به عنوان‌بورخولدریا مالئی شناسایی

شکل ۱- رشد بورخولدریا مالئی **بر روی محیط کشت نوترینت آگار گلیسرینه**

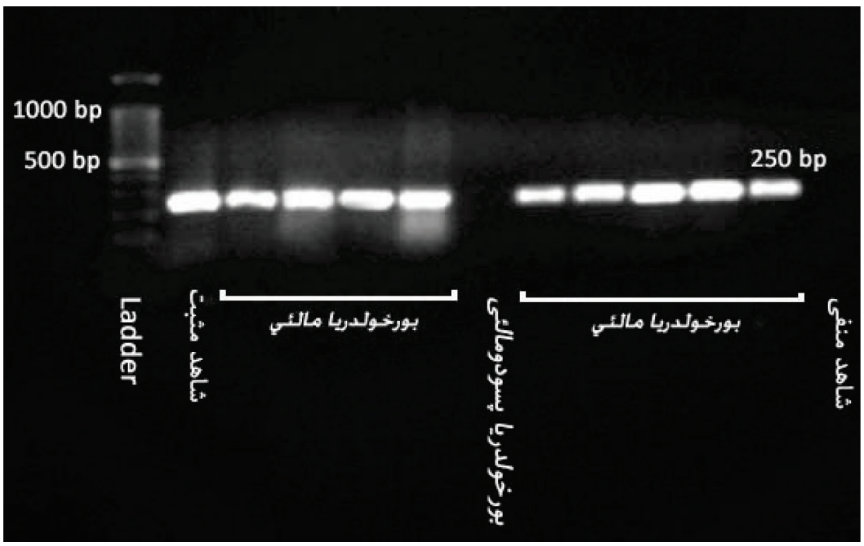
شکل ۲- نتایج حاصل از ورود سوسپانسیون باکتری بورخولدریا مالئی **در کیت API20E**

شدند (شکل ۲).

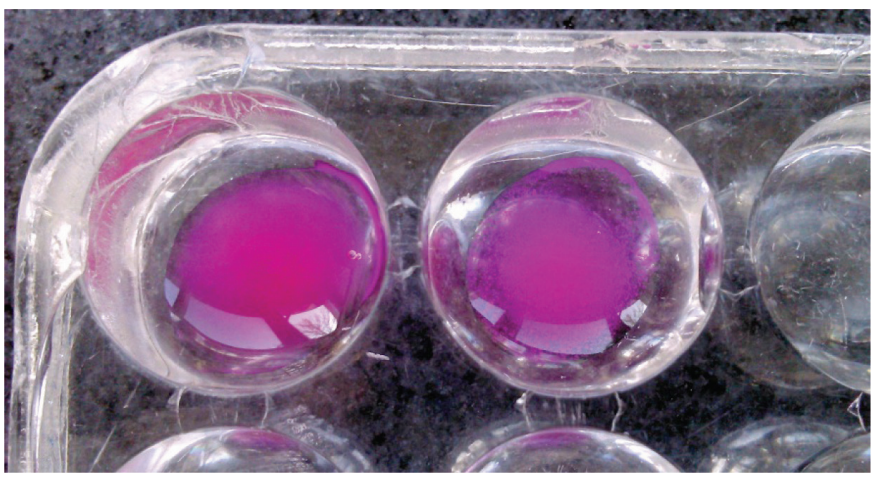
پس از تهیه DNA ژنومی غلظت DNA بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ نانوگرم/میکرولیتر تعیین گردید و با انجام آزمون PCR و مشاهده قطعه ۲۵۰ جفت بازی در تصویر برداری با ژل الکتروفورز حضور و خلوص باکتری در محیط کشت اثبات شد (شکل ۳).

عدم رشد باکتری بعد از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نشانگر غیرفعال شدن کامل باکتری در مرحله آماده‌سازی پادگن بود.

نتایج حاصل از تست رز بنگال برای سرم مثبت، به صورت ۳ مثبت (+++) تجمع‌های کمی کوچکتر با وضوح ناقص مخلوط (تقریباً ۷۵ درصد)



شکل ۳- تعیین هویت باکتری بورخولدریا مالئی **با انجام PCR**



شکل ۴- آگلوتیناسیون آنتی ژن رزبنگال: سمت راست آگلوتیناسیون مثبت و سمت چپ آگلوتیناسیون منفی.

و برای سرم منفی به صورت منفی مشاهده شد (شکل ۴). در نهایت با استفاده از فرمول‌های ذکر شده، میزان حساسیت و ویژگی تست رز بنگال به ترتیب ۱۰۰ و ۸۸ درصد بدست آمد.

بحث

مشمشه بیماری مشترك بین انسان و دام است و عامل ایجادکننده آن (بورخولدریا مالئی) در طبقه‌بندی جنگ‌افزارهای بیولوژیك، جزو ارگانیسم‌های گروه دوم طبقه‌بندی شده است. از ویژگی‌های این گروه آن است که با سهولت نسبی انتشار می‌یابند، بیماری با شدت متوسط، مرگ و میر به بار می‌آورند و نیاز مبرمی به اقدامات تشخیصی خاص و نظارت دارند (۲). گسترش جنگ در منطقه خاورمیانه و همچنین گزارش‌های متعدد از اپیدمی‌های نقطه‌ای در کشور ایران (۹ و ۱۰)، بروز نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب در هنگام استفاده از تست‌های سرولوژیکی که منجر به گسترش بیماری به سایر مناطق می‌شود، لذا به کارگیری یک روش سریع جهت تشخیص بیماری مشمشه در شناسایی افراد آلوده به باکتری بورخولدریا مالئی ضروری است.

پادتن‌ها در عفونت بورخولدریا مالئی در عرض یك هفته یا بیشتر ظاهر می‌شود و به سرعت به اوج عیار خود (۱:۱۰۰۰ تا ۱:۲۰۰۰) می‌رسد و تا ماه‌ها در تعداد قابل توجهی از حیوانات عفونی وجود دارند. روش‌های تشخیصی بر پایه پادتن‌های اختصاصی (IgG) سرم از سنجش‌های نویدبخش هستند، زیرا پاسخ‌های پادتنی قوی در عفونت بورخولدریا مالئی (حدود ۹۰ درصد اسب‌ها و قاطرها تولید پادتن‌های سرمی می‌کنند) برانگیخته می‌شوند. از این رو با توجه به حساسیت‌های پیش رو در زمینه تشخیص، غربالگری و ریشه کنی بیماری مشمشه در کوتاه‌ترین زمان ممکن و جلوگیری از شیوع این بیماری، نیاز به انتخاب، راه‌اندازی و گسترش یک تست سریع شناسایی با اهدافی شامل ارزان قیمت بودن و در دسترس بودن و جوابدهی سریع‌تر می‌باشد.

تشخیص به موقع بیماری نه تنها برای اجرای برنامه‌های تست و کشتار در مناطق بومی بیماری بلکه برای پیشگیری از شیوع بیماری به کشورهای عاری از مشمشه در گردونه تجارت جهانی امری ضروری می‌باشد. مفید بودن یك آزمون تشخیصی بستگی به میزان حساسیت، ویژگی، صحت، ارزش پیشگویی و قابلیت کاربرد فیلدی آن دارد. محاسبه توافق بین آزمون‌های جدید و آزمون‌های موجود به عنوان معیار ارزیابی آزمون‌های جدید پیشنهاد شده است.

مالئیناسیون، تستی که در حال حاضر در کشور انجام می شود، به حداقل ۴۸ ساعت زمان جهت بررسی نیاز دارد و با تزریق آنتی‌ژن مالئین در پلک پایین چشم اسب صورت می‌گیرد که با کوچک‌ترین اشتباهی در هنگام تزریق احتمال نابینایی اسب وجود دارد. تزریق و قضاوت آن منحصراً باید توسط دکتر دامپزشک دوره دیده و ورزیده انجام شود که کار بسیار مشکلی است و احتمال خطای آن بالا می‌باشد، لذا در تکنیک‌های مانند رز بنگال پس از خونگیری، سرم اسب جدا شده و تمامی کارهای مربوطه در آزمایشگاه انجام می‌گیرد و خطاهای احتمالی را کنترل می‌کنند. از سوی دیگر به علت ارتباط آنتی‌ژنی قوی بین بورخولدریا مالئی و بورخولدریا پسودومالئی ممکن است روش رز بنگال بتواند پادتن‌های دارای واکنش متقاطع با بورخولدریا پسودومالئی را تشخیص دهد و لذا امکان بروز واکنش‌های مثبت کاذب در مناطق بومی ملیوئیدوز وجود دارد.

اولین تلاش‌ها برای تشخیص و شناسایی مشمشه به روش رز بنگال در دنیا در روسیه انجام شد اما هیچ گونه مدارکی از آن در دسترس نیست. در سال ۲۰۰۷ نائورین و همکارانش در کشور پاکستان تلاش‌هایی را برای شناسایی مشمشه به وسیله تست رزبنگال با استفاده از باکتری‌های بدست آمده از شیوع‌های مختلف این بیماری، انجام دادند. آن‌ها در این پژوهش نتایج خود را با تست مالئیناسیون مقایسه کردند و مقایسه آن‌ها به این نتیجه منجر شد که مالئیناسیون حساسیت و ویژگی در حدود ۷۶ و ۹۰ درصد و تست رز بنگال حساسیت و ویژگی در حدود ۹۰ و ۱۰۰ درصد را برای تشخیص مشمشه داشت (۸). نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر مطابقت داشت اما نائورین و همکارانش موفق به پایداری این تست نشده و در مرحله اولیه متوقف شدند.

حساسیت بالاتر آزمون آگلوتیناسیون و همچنین وجود طیفی از واکنش‌ها (از درجه آگلوتیناسیون ++ تا ++++) در نمونه‌های سرم قابل توجه است که به نظر می‌رسد قابل مقایسه با دیگر آزمون‌های آگلوتیناسیون باشد. به طوری که در سال ۲۰۱۲، در تست پیشنهادی OIE، تست رزبنگال نیز به چشم می‌خورد. در تست مالئیناسیون به دلیل آسیب رسیدن به حیوان و احتمال کوری اسب در صورت حرفه‌ای نبودن کارشناس و یا خطای احتمالی دامپزشک و همچنین احتمال واکنش متقاطع با باکتری بورخولدریا سودومالئی این تست در رده‌های پائین تر قرار گرفت (۵).

در مواردی امکان دارد ویژگی تست رز بنگال با توجه به نتایج مثبت کاذب و به دلیل تزریق گسترده تست مالئیناسیون اتفاق بیفتد. اما در نهایت با بهینه کردن تست رزبنگال، نتایج مثبت کاذب و اثرات تداخلی کاهش می‌یابد و همچنین مقایسه تست رزبنگال و آزمون مالئیناسیون نشان می‌دهد که تست رزبنگال می‌تواند به عنوان تست مکمل در کنار تست مالئین به کار رود.

این آزمون دارای قابلیت اجرایی راحتی بوده، نیازمند لوازم خاصی نبوده، آموزش محدودی لازم داشته و نتایج آن در مدت دو دقیقه حاصل شده و از طرفی قابلیت اجرایی در شرایط فیلدی را دارد. لذا با توجه به سادگی، سرعت و سهولت انجام آزمون RBT، قابلیت استفاده از آن به عنوان آزمون تکمیلی برای تشخیص مشمشه تك‌سمیان در شرایط فیلدی وجود دارد. با این حال، در تست رزبنگال با استفاده کردن از آنتی‌ژن اختصاصی گلیکولیپیدی ویژگی این تست به طور قابل ملاحظه‌ای بالا می‌رود که دلیلی بر تشخیص قطعی باکتری است و معدوم‌سازی نمونه‌های آلوده با دقت بیشتری صورت می‌گیرد (۱۱).

تشکر و قدردانی

این مطالعه از نظر مالی توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مورد حمایت قرار گرفته است. با سپاس فراوان از تمام کارکنان موسسه رازی، بخصوص کارکنان بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین که در این تحقیق ما را یاری کردند.

منابع مورد استفاده

1- Whitlock, G.C. (2007). Mark Estes D, Torres AG. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS microbiol let* 277(2): 115-22.

2- Van Zandt, E.K., Greer, M.T., Gelhaus, H.C. (2013). Glanders: an overview of infection in humans. Orphanet J Rare Dis 8: 131-6.

3- DiSalvo, S., Haselkorn, T.S., Bashir, U.2., Jimenez, D., Brock, D.A., Queller D.C., Strassmann, J.E. (2015). Burkholderia bacteria infectiously induce the proto-farming symbiosis of Dictyostelium amoebae and food bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(36): 5029-37.

4- Singha, H., Malik, P., Goyal, S.K., Khurana, S.K., Mukhopadhyay, C., Eshwara, V.K., Singh, R.K. (2014). Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of Glanders amongst equines. *Sci World J* 2014: 1-6.

5- OIE Terrestrial Manual. (2016). Glanders, Chapter 2.5.11: 919-28.

6- Zhang, B., Wear, D.J., Kim, H.S., Weina, P., Stojadino vic, A., Izadjoo, M. (2012). Development of hydrolysis probe-based real-time PCR for identification of virulent gene targets of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*-a retrospective study on archival cases of service members with melioidosis and glanders. *Mil Med* 177(2): 216-21.

7- Merk, S., Neubauer, H., Meyer, H., Greiser-Wilke, I. (2001). Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste water. *Int J Hyg Environ Health* 204(2-3): 127-31.

8- Naureen, A., Saqib, M., Muhammad, G., Hussain, M.H., Asi, M.N. (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): 362-7.

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

10- Bazargani, T., Tadjbakhsh, H., Badii, A., Zahraei, T. (1996). The outbreak of glanders in some racehorses in three states of Iran. *J Equine Vet Sci* 16(6): 232-36.

11- De Shazer, D., Waag, D.M., Fritz, D.L., Woods, D.E. (2001). Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *Microbial Pathogen* 30(5): 253-69.