تحقیقی

ساختار ژنتیکی *بورخولدریا مالئی* رازی ۳۲۵، سویه مورد استفاده در تولید صنعتی مالئین در ایران

الیکا فرج تبریزی[۱و۲]، دکتر کیوان تدین*[۳]، دکتر نادر مصوری[۳]، دکتر الهه تاجبخش[٤]، دکتر روح اله کشاورز[٥]، دکتر راینا‌ک قادری[٥]

محمد سخاوتی[٦]، رضا بنی هاشمی[٦]، رضا نجف پور[۱و۲]، مریم مهره کش حقیقت[۲]، مهدی دهقان پور[۷]

۱- کارشناس ارشد میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. ۲- کارشناس ارشد میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ۳- دانشیار میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ٤- دانشیار، میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. ٥- دامپزشک و کارشناس ارشد واکسن و سرم، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ،کرج، ایران. ٦- کارشناس ارشد واکسن و سرم، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ۷- کارشناس آزمایشگاه، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *ایران یکی از کانون‌های باقی‌مانده مهم مشمشه در خاورمیانه است و برای انجام آزمایش مالئیناسیون و شناسایی دام‌های مبتلا به مشمشه و یا آلوده از سویه غیربـومی Burkholderia mallei Razi 325 بـرای تولیـد مـالئین اسـتفاده مـی‌گـردد. روش ژنوتایپینـگ Multi Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) به عنوان روش بین‌المللی تایپینگ بورخولدریا مالئی پذیرفته شده اسـت. این مطالعه به منظور شناسایی ساختار ژنتیکی بورخولدریا مالئی رازی ۳۲۵، سویه مورد استفاده در تولید صنعتی مالئین در ایران انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی از روش MLVA genotyping با اسـتفاده از ٤ لوکـوس شـناخته شـده VNTR140، VNTR1367، VNTR2065 و VNTR2971 و ۲ لوکوس جدید VNTR24 و VNTR41 استفاده گردید.*

یافته‌ها : *نتیجه با بهینه‌سازی فرآیند PCR انجام آمپلیفیکاسیون هر ٦ منطقه ژنتیکی به‌صورت همزمان توسط یک پروتکل مقـدور گردیـد. محصولات آمپلیفیکاسیون تعیین توالی شدند. در ژنـوم ایـن سـویه در لوکـوس‌هـای VNTR140، VNTR1367، VNTR2065، VNTR2971، VNTR24 و VNTR41 به ترتیب ۲، ۳، ۱۲ ، ٦ ، ۱ و ۲ کپی از واحدهای تکرار شونده خاص هر لوکوس وجود داشت. این سـاختار ژنتیکـی با آنچه از سویه چینی Burkholderia mallei ATCC 23344 و سویه‌های Burkholderia mallei BMQ و Burkholderia mallei SAVP1 شناخته شده است؛ مقایسه گردید.*

نتیجه‌گیری : *نتایج حاصله امکان تشخیص افتراقی میان Razi 325 و سویه‌های فوق را به کمک این لوکوس‌ها نشان داد.*

کلید واژه‌ها : *مشمشه ، مالئین ، بورخولدریا مالئی Razi 325 ، ژنوتایپینگ MLVA ، VNTR*

* نویسنده مسؤول : دکتر کیوان تدین ، پست الکترونیکی k.tadayon@rvsri.ac.ir

نشانی : کرج، حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کدپستی ۳۱۹۷٦۱۹۷۵۱ ، تلفن ۳٤٥۰۲۸۹۲-۰۲٦ ، نمابر ۳٤٥٥۲۱۹٤

وصول مقاله : ۱۳۹۳/۱۲/٦ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٤/٥/۱۹ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/٥/۳۱

مقدمه

قـدیمی‌تـرین توضـیحات مسـتند در مـورد مشمشـه (Glanders) توسط بقراط و ارسطو در سال‌های ۴۲۵ و ۳۵۰ قبـل از مـیلاد مسیح ارایه شده است (۱). با ایـن‌حـال شناسـایی و جداسـازی *بورخولـدریا مالئی* به عنوان عامل بیماری تـا پـیش از سـال ۱۸۸۲ ممکـن نگردیـد (۲). در حال حاضر وقوع طبیعی مشمشه از نظر جغرافیایی محدود به بخش‌هایی از آسیا (۳و۴)، خاورمیانه (۵و۶)، آفریقا و نیـز آمریکـای جنوبی (۲و۷) می‌گردد. ایـران همچنـان یکـی از کـانون‌هـای اصـلی اندمیک بیمـاری در غـرب آسـیا محسـوب مـی‌گـردد (۶). جـوزف دزیره تولوزانی، پزشک فرانسوی ناصـرالدین شـاه در قـرن نـوزدهم میلادی به وجود بیماری در تک سمی‌های ایران اشاره نمـوده اسـت (۸). وقـوع اپیـدمی مشمشـه در سـال ۱۳۸۹ در میـان شـیر و ببرهـای باغ‌وحش تهران از جدیدترین موارد بیماری اسـت کـه در نتیجـه آن چندین قلاده از گرانبهاترین گونه‌های کمیاب این گربه‌سانان تلف و یا بنابر ملاحظات قرنطینه به ناچار معدوم شدند (۶).

در جنس *بورخولـدریا* بیش از ۴۳ گونه مستقل شناسایی و تعریف شده است (۹و۱۰). در ایـن میـان *بورخولـدریا مالئی* و *بورخولـدریا سودومالئی* (عامل Melioidosis) به عنوان دو گونه بسیار نزدیـک از نظر خصوصـیات فنـوتیپی و ژنـوتیپی و همچنـین تظـاهرات بیمـاری ایجاد شده در انسان و دام بیمار شناخته می‌شوند (۱۱).

روش ژنوتایپینگ وابسته به PCR به نام MLVA (Multi locus Variable Number Tandem Repeatanalysis) در مطالعات اپیدمیولوژی و فیلوژنی باکتری‌های بیماری‌زا کاربرد دارد. در مطالعه‌ای با غربالگری ژنوم کامل *بورخولدریا مالئی* و *بورخولدریا* سودومالئی تعداد ۳۲ لوکوس ژنتیکی در قالب یک سیستم ژنوتایپینگMLVAبرای این پاتوژن‌ها معرفی شد (۱۲). در مطالعه دیگری تعداد ۱۰ لوکوس دیگر VNTR معرفی و کاربری آنها در تایپینگ هر دو پاتوژن نشان داده شد (۱۳).

در شرایطی که منطقه غرب آسیا و خاورمیانه یکی از کانون‌های قدیمی و پایدار اندمیک مشمشه محسوب می‌گردد؛ در بحرین (۱۴و۱۵)، پاکستان (۴) و امارات متحده عربی (۱۶) اپیدمیولوژی مشمشه با استفاده از روش‌های مولکولار بیولوژی مورد بررسی قرار گرفته است. ضمن آنکه ژنوم یک سویه هندی *بورخولدریا مالئی* به طور کامل تعیین توالی گردیده و اطلاعات آن پیش از این منتشر شده است (۱۷). این مطالعات نشان داده‌اند جمعیت این باکتری از تنوع ژنتیکی قابل توجه در منطقه برخوردار است. نقش سنتی تک‌سمیان به‌ویژه اسب در اقتصاد کشورهایی نظیر پاکستان و اهمیت آن در ورزش پرطرفدار و تاریخی اسب دوانی در ایران و کشورهای عربی منطقه به عنوان عامل موثر در پایداری پاتوژن و تنوع ژنتیکی آن معرفی شده است (۴).

در مطالعه حاضر با به‌کارگیری روش MLVA و با استفاده از ۶ لوکوس ژنتیکی ساختار ژنتیکی سویه *B. mallei*Razi325 مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج به‌دست آمده با ۳ سویه *Burkholderia mallei ATCC 23344* (این سویه چینی در سال ۱۹۴۴ از یک بیمار مبتلا به مشمشه جدا شده است) (۱۸)؛*Burkholderia mallei* BMQ و *Burkholderia mallei* SAVP1 که پیش از این ژنوم آنها به‌صورت کامل تعیین توالی ژنتیکی شده؛ مقایسه شده است. *بورخولدریا مالئی* دارای ۲ کروموزوم است که به‌نام کروموزوم‌های بزرگ (I) و کوچک (II) شناخته می‌شوند.

این مطالعه به منظور شناسایی ساختار ژنتیکی *بورخولدریا مالئی* رازی ۳۲۵، سویه مورد استفاده در تولید صنعتی مالئین در ایران انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ انجام گردید.

کشت باکتری

سویه *B. mallei* Razi 325 درون یک لوله کشت محتوی محیط ژلوز گلیسیرینه کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تا زمان مشاهده پرگنه‌های باکتری نگهداری شد.

استخراج ماده ژنتیکی باکتری

روش ساده جوشانیدن مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). معادل یک لوپ کامل (10 µl) از کشت ۴۸ ساعته باکتری توسط آنس یک‌بار مصرف برداشت و به 400 µl بافر TB-lysis موجود در یک میکروتیوب دارای واشر ضد نشت (O-ring) انتقال داده شد. میکروتیوب به کمک یک وزنه فلزی در عمق بن‌ماری محتوی آب در حال جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) استقرار یافت و به مدت ۳۰ دقیقه در همین وضعیت نگه داشته شد تا باکتری غیرفعال گردد. سپس میکروتیوب به خارج از بن‌ماری انتقال یافت و پس از خنک شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی به‌دست آمده محتوی ژنوم باکتری با دقت برداشته شد و از فیلتر سرسرنگی 0.2 µl عبور داده شد تا از فقدان باکتری زنده در مایع صاف شده اطمینان حاصل گردد. سوسپانسیون محتوی ماده ژنتیکی باکتری تا زمان مصرف در یخچال یا فریزر آزمایشگاه نگهداری شد. این سوسپانسیون به‌صورت مستقیم در واکنش‌های PCR به کار گرفته شد.

آزمون MLVA

انتخاب لوکوس‌های VNTR

از مجموع ۶ لوکوس VNTR مورد استفاده در این مطالعه ۴ لوکوس بر اساس مطالعه U'Ren (۱۲) انتخاب شدند.

لوکوس‌ها شامل VNTR140 ، VNTR1367 ، VNTR2065 و VNTR2971 بودند. لوکوس‌های VNTR2065 و VNTR1367 برروی کروموزوم کوچک و لوکوس‌های VNTR2971 و VNTR140 برروی کروموزوم بزرگ باکتری استقرار دارند. انتخاب این ۴ لوکوس براساس میزان پلی‌مورفیسم مشاهده شده منتسب به آنها صورت پذیرفت که به اصطلاح Nei's Diversity Index شناخته می‌شود (۱۲). در تحقیق U'Ren همه ۴ لوکوس انتخابی از بالاترین مقادیر اندیس تنوع ژنتیکی برخوردار بودند (۱۲). علاوه بر این در مطالعه حاضر از دو لوکوس جدید نیز استفاده گردید. ژنوم کامل (دو کروموزوم کوچک و بزرگ) سویه *Burkholderia mallei* (ATCC 23344) با استفاده از نرم‌افزار Tandem Repeat Finder ver و با استفاده از مؤلفه‌های پیش‌فرض نرم‌افزار مورد جستجو قرار گرفت. بدین ترتیب لوکوس‌های VNTR41 و VNTR24 با واحدهای تکرار شونده به ترتیب ۵ و ۲۴ زوج باز انتخاب شدند (جدول یک).

انتخاب و طراحی پرایمر

زوج پرایمرهای پیشنهادی U'Ren در مورد لوکوس VNTR1367 مورد استفاده قرار گرفتند. در مورد بقیه لوکوس‌ها از جمله VNTR24 ، VNTR2065 ، VNTR2971 ، VNTR41 و VNTR140 بااستفاده از نرم‌افزار آرتمیس بخشی از ژنوم باکتری به طول تقریبی 2 Kb به گونه‌ای انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر

جدول ۱ : ویژگی‌های لوکوس‌های ژنتیکی VNTR و پرایمرهای مورد استفاده در آملیفیکاسیون آنها

Locus/ primer	Chromosome	Consensus repeat sequence	Nucleotide sequence (5′→ 3′)	Amplicon size (bp) Razi 325	ATCC23344 SAVP1	BMQ	منبع	
VNTR24f	Large (I)	GCGCGAACTGCG ACGACATCCGCT	TTC TCG AAC TCG CCC TTC AC	٦٠٤	٦٢٨	٦٢٨	٦٥٢	مطالعه حاضر
VNTR24r			CGG TGT TTT CGG TGC ATC TG					
VNTR41f	Large (I)	GGCGC	ATG AGC TTC TGC CCA TCG AC	٥٠٩	٥٠٩	٥٠٩	٥٠٩	مطالعه حاضر
VNTR41r			GTT GGG AAT AGA ACG GCG TG					
VNTR140f	Small (II)	GCGCCGAA	GTC GGG CAT TCC GTT TCA GA	٥٦٣	٥٧١	٥٧١	٥٦٣	U'Ren و همکاران (١٤)
VNTR140r			AAC GGG AAG GGC GAG TCT					
VNTR1367f	Small (II)	ACATCGAAC	GGC GCT GCC GTG GCC GGA CGA C	٥٠٤	٤٩٥	٤٦٨	٤٨٦	
VNTR1367r			GCC GGC GAA GCA TCG AGG CGG					
VNTR2065f	Small (II)	TCGATGAC	GGA AGT CCC CGA GTG AAC TG	٦٧٤	٦٧٤	٦٥٨	٦٦٦	
VNTR2065r			GTT ACG ACT TCT CCG GGC AT					
VNTR2971f	Small (II)	AAGCACG	AAC GAC GGT GTG GTC TTT CA	٧٤١	٧٤٨	٧٤١	٦٣٤	
VNTR2971r			CAA CAC GCT CGT CTA CCT GA					

جدول ۲ : اجزاء ساختار و پروتکل چرخه‌های دما – زمان واکنش‌های PCR مورد استفاده

PCR protocol	PCR master mix (µl)	Primer forward1 (µl)	Primer reverse1 (µl)	MgCl22 (µl)	DNA template (µl)	PCR water (µl)	Total volume (µl)
۱	٦	۱	۱	۰	۲/٥	۱/٥	۱۲
۲	٦	۱	۱	۰/۳٦	۲/٥	۱/۱٤	۱۲
۳	٦	۰/۲	۰/۲	۰	۲/٥	۳/۱٥	۱۲
٤	٦	۰/۲	۰/۲	۰/۳٦	۲/٥	۲/۷٤	۱۲
Universal	٦	۰/۲	۰/۲	۰	۱/٥	٤/۱	۱۲

تقریباً در قسمت میانی قطعه قرار داشته باشد. برای طراحی پرایمر از برنامه Primer 3 استفاده شد (۲۰و۲۱). پیش‌فرض‌های برنامه به گونه‌ای تنظیم گردید که اندازه مورد انتظار محصولات PCR در محدوده ۷۰۰–۵۰۰ زوج باز قرار داشته باشند (جدول یک).

PCR

برای بهینه‌سازی شرایط PCR و دستیابی به یک پروتکل مشترک و واحد قابل استفاده برای همه ۶ لوکوس، ۲۴ واکنش PCR در مورد هر لوکوس انفرادی در قالب ۴ گروه ۶ عددی به گونه‌ای تنظیم و پیش‌بینی گردید که ۶ واکنش PCR مترادف با ۶ دمای مختلف annealing (۵۵، ۵۶/۷، ۵۹/۱، ۶۰/۴ ، ۶۲/۹ و ۶۴/۹ درجه سانتی‌گراد) انتخاب شدند. در عین حال در دو گروه میزان پرایمر مصرفی (۱ و یا ۵ پیکومول) و در دو گروه دیگر میزان کلرید منیزیوم (1mM یا 2.5 mM) به‌عنوان متغیر اعمال گردید. مواد و اجزاء متعارف مورد نیاز در واکنش‌های PCR (به‌جز پرایمرها و DNA template) به‌صورت آماده مصرف به صورت کیت با نام تجاری آمپلیکور (Ampliquor®, Denmark) مورد استفاده قرار گرفتند. پرایمرهای مورد استفاده توسط آزمایشگاه همکار (ماکروژن کره جنوبی) تهیه شدند. به منظور صرفه‌جویی در زمان اجرا و صرفه‌جویی در مصرف موارد اولیه از روش master mix استفاده شد و حجم هر واکنش PCR برابر با ۱۲ µL تنظیم گردید. از Double Distilled PCR water به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. واکنش PCR شامل یک مرحله Initial denaturation با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه و به دنبال آن ۳۰ نوبت چرخه‌های متوالی Denaturation با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، annealing به مدت ۳۰ ثانیه، Extension با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک مرحله نهایی تکمیلی (Final extension) به مدت ۶۰۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. اجزاء سازنده واکنش‌های PCR در جدول ۲ آمده است.

الکتروفورز و تصویرنگاری ژل

ژل ۱/۵ درصد آگاروز (Invitrogen® , USA) از پیش رنگ شده با Red Safe ® مورد استفاده قرار گرفت. رانش ژل بارگذاری شده با محصولات PCR در میدان الکتریکی به قدرت 2 V/cm به مدت ۲ ساعت انجام و تصاویر حاصله در جریان عکسبرداری از ژل با باندهای DNA size marker ساخت مؤسسه رازی (۲۲) مقایسه گردید تا اندازه تقریبی محصولات PCR تعیین شود.

بهینه‌سازی شرایط اجرای PCR

با بررسی نتایج تصویری آزمون‌های چهارگانه هر لوکوس و بازنگری یافته‌های مربوط به ۶ لوکوس یک پروتکل واحد دما و غلظت اجزاء سازنده (منیزیوم کلراید و پرایمر) در مورد همه لوکوس‌ها انتخاب شد (جدول ۲). این پروتکل در اجرای PCR همه ۶ لوکوس انتخاب شده به‌کار گرفته شد.

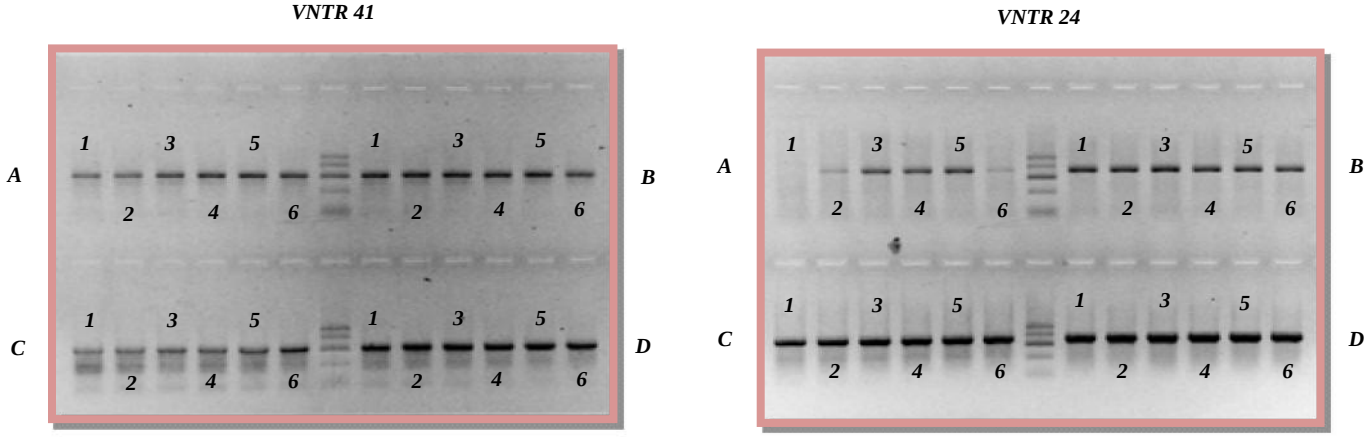
تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR

توالی نوکلئوتیدهای هر ۶ آمپلیکون به‌دست آمده مربوط به سویه *B. mallei* Razi 325 در آزمایشگاه همکار (ماکروژن کره جنوبی) تعیین توالی گردید و یافته‌ها با به‌کارگیری نرم‌افزارهای تخصصی نظیر Clustal (۲۳) و Chromas lite Version 2.1. (۲۴) پردازش گردیدند.

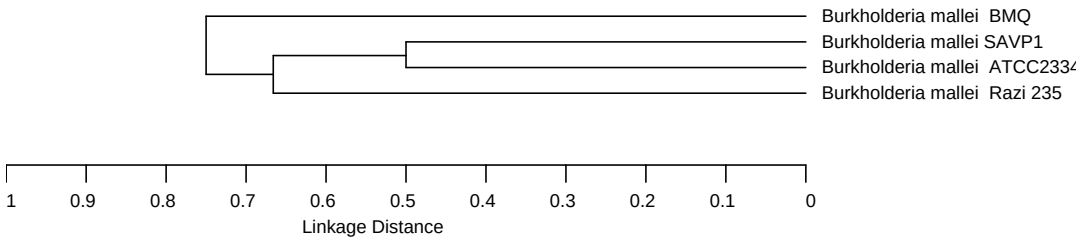
یافته‌ها

با موفقیت در دستیابی به یک پروتکل مشترک (universal) PCR (دما و اجزاء سازنده) امکان آمپلی‌فیکاسیون هر ۶ لوکوس مربوط به ژنوم *B. mallei* Razi 325 فراهم گردید (شکل یک و جدول ۲). بدین ترتیب ۶ محصول PCR تولید و تمامی آنها تعیین توالی نوکلئوتیدی شدند.

در لوکوس VNTR140 که متشکل از یک واحد تکرار شونده به طول ۸ نوکلئوتید (GCGCCGAA) بود؛ در ژنوم سویه *B. mallei* Razi 325 تعداد ۲ تکرار از این واحد مشاهده گردید. در مقایسه با ژنوم سویه *B. Mallei* ATCC 2344 که کروموزوم‌های آن به‌طور کامل تعیین توالی شده‌اند؛ ۳ تکرار از این واحد وجود داشت. در لوکوس VNTR1367 متشکل از یک واحد تکرار شونده به طول ۹ نوکلئوتید (ACATCGAAC) در ژنوم سویه *B. mallei* Razi 325 تعداد ۳ تکرار و در سویه *B. mallei* ATCC 2344 تعداد۲ تکرار از این واحد مشاهده گردید. در لوکوس VNTR2065 از یک واحد تکرار شونده به طول ۸ نوکلئوتید (TCGATGAC) ۱۲ تکرار در ژنوم هر دو سویه *B. mallei* Razi 325 و *B. mallei* ATCC 2344 مشاهده شد. در لوکوس VNTR2971 تعداد ۶ تکرار از یک واحد تکرار شونده به طول ۷ نوکلئوتید (AAGCACG) در ژنوم سویه *B. mallei* Razi 325 و نیز سویه *B. mallei* ATCC 2344 مشاهده گردید. به‌صورت جالب توجهی در همین لوکوس یک واحد تکرار شونده دیگر به طول ۷ نوکلئوتید (CCGCACG) شناسایی گردید که تعداد ۴ تکرار از آن در ژنوم سویه *B. mallei* Razi 325 و ۵ تکرار در ژنوم سویه B. mallei ATCC 2344 مشاهده شد. در لوکوس VNTR24 تعداد یک کپی از واحد تکراری به طول ۲۴ نوکلئوتید (GCGCGAACTGCGACGACATCCGCT) در ژنوم سویه *B. mallei* Razi 325 شناسایی شد که در ژنوم سویه B. mallei ATCC 2344 تعداد ۲ کپی از این واحد تکراری معرفی شده است. در مورد لوکوس VNTR41 نیز ۲ کپی از یک تکرار شونده به طول ۵ نوکلئوتید (GGCGC) هم در ژنوم سویه *B. mallei* Razi 325 شناسایی شد و هم در ژنوم سویه B. mallei ATCC 2344 مشاهده گردید.



شکل ۱ : بهینه‌سازی فرایند PCR در مورد آزمایش‌های MLVA genotyping مربوط به لوکوس‌های BM 41 و BM 24
نتایج ژل الکتروفورز محصولات آمپلی‌فیکاسیون مربوط به پروتکل‌های A ، B ، C و D است. اعداد ۱ تا ٦ گرادیان دمایی مرحله annealing را به ترتیب برابر با ٥٦/١، ٥٦/٧، ٦٠/١ ، ٦٢/٧ ، ٦٣/٩ و ٦٥/ ٩ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهند. در هر واکنش PCR در سری A و B یک پیکومول از هر پرایمر وجود دارد و میزان همین پرایمرها در مورد سری‌های C و D برابر با پنج پیکومول است. در ارتباط با میزان MgCl2، غلظت این ترکیب در سری‌های B و D برابر با یک میلی‌مولار و غلظت همین ترکیب در واکنش‌های سری A و C برابر ۲/۵ میلی‌مولار است. ستون‌های میانی در هر قسمت تصویر مربوط به DNA size marker است که دارای ۵ باند (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ bp) هستند.



شکل ۲ : درخت UPGMA بر اساس ٦ لوکوس VNTR نمایشی از ارتباط ژنتیکی میان سویه غیرایرانی Burkholderia mallei Razi 325 مورد استفاده در تولید مالئین در ایران با ۳ سویه شناخته شده بین المللی ATCC23344 ، SAVP1 و BMQ

بحث

انجام این مطالعه امکان آمپلیفیکاسیون همزمان هر شش لوکوس VNTR24، VNTR41 ، VNTR140 ، VNTR1367 ، VNTR2065 و VNTR2971 توسط یک پروتکل واحد PCR را نشان داد. علاوه بر این ساختار ژنتیکی سویه *B. mallei* 325 در موقعیت لوکوس‌های فوق شناسایی و تعیین گردید.

در روش ژنوتایپینگ پیشنهادی U'Ren از اولیگونوکلئوتیدهای علامت‌گذاری شده با رنگ‌های فلورسنت استفاده شد (۱۲)؛ اما در مطالعه حاضر با توجه به موضوع محدودیت در تجهیزات و همچنین هزینه، روش کار به گونه‌ای تنظیم گردید که امکان اجرای تمام مراحل آمپلی‌فیکاسیون قطعات ژنومی با استفاده از یک ماشین ترموسایکلر معمولی قابل اجرا باشد. این استراتژی پیش از این در آزمایشگاه نویسندگان با موفقیت در مورد روش SNP typing باسیلوس آنتراسیس به کار گرفته شده است (۱۹).

براساس اطلاعات موجود در مؤسسه رازی، در سال ۱۹۵۶ میلادی یک سویه *بورخولدریا* با نام اصلی *Maleomyces mallei* U-7 از استکهلم سوئد بر روی محیط ژلوز گلیسیرینه به این مؤسسه وارد و از آن پس به نام *Burkholderia mallei* Razi 325 شناخته شد. تهیه و تولید صنعتی مالئین در ایران در تمام نیم قرن گذشته با استفاده از این سویه صورت پذیرفته است.

شناخت ساختار ژنتیکی سویه *B. mallei* Razi 325 دستکم از دو دیدگاه دارای اهمیت است. اولاً از نظر مقررات بین‌المللی ناظر بر تولید فرآورده‌های بیولوژیک که شناسایی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه (بذر) مورد استفاده در تولید فرآورده را ضروری می‌داند و ثانیاً از نظر کسب توانایی تشخیص افتراقی در شرایطی نظیر احتمال بروز آلودگی‌های اتفاقی آزمایشگاهی (cross contamination) در جریان کار با سویه‌های مختلف این باکتری که در آزمایشگاه موجود هستند. با انجام مطالعه حاضر و ارتقاء اطلاعات موجود اکنون دو نگرانی مورد اشاره تا حد زیادی مورد توجه قرار گرفته‌اند. یادآور می‌گردد در حال حاضر مطالعه مشابهی بر روی تعدادی جدایه‌های کلینیکی *بورخولدریا مالئی* که در سال‌های اخیر در ایران از میزبان‌های مختلف در جریان اپیدمی‌های مشمشه جداسازی و جمع‌آوری گردید؛ در حال انجام است (۶).

به منظور آگاهی از ارتباط ژنتیکی میان این سویه با سویه‌های دیگر شناخته شده جهانی، تعداد کپی‌های واحدهای تکرار شونده در لوکوس‌های هم ارز در بین سویه *Burkholderia mallei* Razi 325 و ۳ سویه شناخته شده بین‌المللی *Burkholderia mallei* ATCC23344، *Burkholderia mallei* SAVP1 و *Burkholderia mallei* BMQ که ژنوم آنها به‌طور کامل تعیین توالی شده؛ مقایسه گردید (شکل ۲). این مقایسه درجاتی از تشابه میان این سویه غیربومی ایران و سه سویه دیگر را نشان داد. لوکوس VNTR41 با تنها یک آلل کمترین میزان تنوع ژنتیکی و لوکوس VNTR1367 با چهار آلل بیشترین میزان تنوع ژنتیکی را در میان چهار سویه تحت بررسی نشان داد.

از بین ۶ لوکوس ژنتیکی مورد بررسی در این مطالعه چهار لوکوس (VNTR140، VNTR1367، VNTR2065 و VNTR2971) پیش از این در سیستم بین‌المللی ژنوتایپینگ *بورخولدریا مالئی* و سودومالئی پذیرفته شده و بیشترین سطح تنوع ژنتیکی را از خود نشان داده‌اند. در همین حال از دو لوکوس جدید معرفی شده در مطالعه حاضر (VNTR41 و VNTR24) ساختار لوکوس VNTR41 در میان سویه *Burkholderia mallei* Razi 325 و سه سویه دیگر از تنوع ژنتیکی برخوردار نبود؛ اما در مورد لوکوس VNTR24 با مشاهده ۳ آلل در میان چهار سویه سطح قابل‌توجهی از تنوع ژنتیکی میان سویه‌ها مشاهده گردید و جالب توجه آن که این لوکوس زمینه افتراق میان سویه *Burkholderia mallei* Razi 325 با سه سویه دیگر را به تنهایی فراهم می‌نماید. به‌نظر می‌رسد در بازنگری سیستم ژنوتایپینگ جهانی MLVA این لوکوس می‌تواند مورد توجه قرار گیرد (۱۲).

نتیجه‌گیری

با توسعه مطالعه حاضر و تعمیم آن به تمام جدایه‌های کلینیکی ایران و در کنار آن افزایش تعداد لوکوس‌های ژنتیکی تحت بررسی

می‌توان ضمن دستیابی به درک صحیح‌تر از اپیدمیولوژی مشمشه در ایران کیفیت اجرا و مبانی برنامه مبارزه با این بیماری را در ایران ارتقاء بخشید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم الیکا فرج تبریزی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروب‌شناسی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بود. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی (شماره ۹۰۰۶۰-۱۸-۱۸-۲) هزینه‌های اجرا و علاوه بر آن فضای آزمایشگاهی مناسب برای انجام این تحقیق را تامین نموده است. نویسندگان مقاله مراتب احترام خود را نسبت به مرحوم دکتر فتح‌اله انتصار و دکتر هادی هدایتی رؤسای پیشین و نیز کارکنان بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین و نیز واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی مؤسسه رازی اعلام می‌نمایند. از آقای شجاعت دشتی‌پور به خاطر کمک در انجام کشت‌های میکروبی تشکر می‌گردد.

References

1. Howe C, Sampath A, Spotnitz M. The pseudomallei group: a review. J Infect Dis. 1971 Dec; 124(6):598-606.

2. Dvorak GD, Spickler AR. Glanders. J Am Vet Med Assoc. 2008 Aug; 233(4):570-7. doi: 10.2460/javma.233.4.570

3. Malik P, Singha H, Khurana SK, Kumar R, Kumar S, Raut AA, et al. Emergence and re-emergence of glanders in India: a description of outbreaks from 2006 to 2011. Vet Ital. 2012 Apr-Jun; 48(2):167-78.

4. Hornstra H, Pearson T, Georgia S, Liguori A, Dale J, Price E, et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. Emerg Infect Dis. 2009 Dec; 15(12):2036-9. doi: 10.3201/eid1512.090738

5. Parker L, Creek B. Bioterrorism and Intelligence. Global Security Studies. 2013; 4(3): 53-63.

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

7. Mota RA, da Fonseca Oliveira AA, da Silva AM, Junior JW, da Silva LB, de Farias Brito M, Rabelo SS. Glanders in donkeys (Equus Asinus) in the state of pernambuco, Brazil: A case report. Braz J Microbiol. 2010 Jan; 41(1):146-9. doi: 10.1590/S1517-838220100001000021

8. Théodoridès J. [A great Franco-Mauritian epidemiologist: Joseph Désiré Tholozan (1820-18970]. Bull Soc Pathol Exot. 1998; 91(1):104-8. [Article in French]

9. Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Ait Barka E. Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. FEMS Microbiol Rev. 2008 Jul; 32(4):607-26. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00113.x

10. Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Déziel E. Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechnol. 2007 Sep; 17(9):1407-29.

11. Sprague LD, Zysk G, Hagen RM, Meyer H, Ellis J, Anuntagool N, Gauthier Y, Neubauer H. A possible pitfall in the identification of Burkholderia mallei using molecular identification systems based on the sequence of the flagellin fliC gene. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Nov; 34(3):231-6.

12. U'Ren JM, Schupp JM, Pearson T, Hornstra H, Clark Friedman CL, Smith KL, et al. Tandem repeat regions within the Burkholderia pseudomallei genome and their application for high resolution genotyping. BMC Microbiol. 2007; 7:23. doi: 10.1186/1471-2180-7-23

13. Michelle Wong Su Yen, Lisanti O, Thibault F, Toh Su San, Loh Gek Kee, Hilaire V, et al. Validation of ten new polymorphic tandem repeat loci and application to the MLVA typing of Burkholderia pseudomallei isolates collected in Singapore from 1988 to 2004. J Microbiol Methods. 2009 Jun; 77(3):297-301. doi: 10.1016/j.mimet.2009.03.005

14. Wernery U, Wernery R, Joseph M, Al-Salloom F, Johnson B, Kinne J, et al. Natural Burkholderia mallei infection in Dromedary, Bahrain. Emerg Infect Dis. 2011 Jul; 17(7): 1277-79. doi: 10.3201/eid1707.110222

15. Scholz HC, Pearson T, Hornstra H, Projahn M, Terzioglu R, Wernery R, et al. Genotyping of Burkholderia mallei from an outbreak of glanders in Bahrain suggests multiple introduction events. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Sep; 8(9):e3195. doi: 10.1371/journal.pntd.0003195

16. Scholz HC, Joseph M, Tomaso H, Al Dahouk S, Witte A, Kinne J, et al. Detection of the reemerging agent Burkholderia mallei in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Apr; 54(4):241-7.

17. Johnson SL, Bishop-Lilly KA, Ladner JT, Daligault HE, Davenport KW, Jaissle J, et al. Complete genome sequences for 59 Burkholderia isolates, both pathogenic and near neighbor. Genome Announc. 2015 Mar-Apr; 3(2): e00159-15. doi: 10.1128/genomeA.00159-15

18. Winsor GL, Khaira B, Van Rossum T, Lo R, Whiteside MD, Brinkman FS. The Burkholderia Genome Database: facilitating flexible queries and comparative analyses. Bioinformatics. 2008 Dec; 24(23):2803-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btn524

19. Najafi Olya Z, Tadayon K, Ghaderi R. [A simplified van erth single nucleotide polymorphism (SNP) typing method of bacillus anthracis applicable by traditional thermocycler machines]. Medical Laboratory Journal. 2015; 9(1): 97-103. [Article in Persian]

20. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 2012 Aug; 40(15):e115.

21. Email author JY, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012; 13:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134

22. Sekhavati M, Tadayon K, Ghaderi R, Banihashemi R, Jabbari AR, Shokri Gh, et al. "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal Bacillus anthracis strain. Iran J Microbiol. 2015; 7(1): 45-49.

23. Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. Nucl Acids Res. 2015; gkv279. doi: 10.1093/nar/gkv279

24. Stucky BJ. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. J Biomol Tech. 2012 Sep; 23(3):90-3. doi: 10.7171/jbt.12-2303-004

Original Paper

Genomic structure of *Burkholderia mallei* Razi 325, the strain used for industrial production of Mallein in Iran

Faraj Tabrizi E (M.Sc)[1,2], Tadayon K (Ph.D)*[3], Mosavari N (Ph.D)[3], Tajbakhsh E (Ph.D)[4] Keshavarz R (DVM)[5], Ghaderi R (Ph.D)[5], Sekhavati M (M.Sc)[6], Banihashemi R (M.Sc)[6] Najafpour R (M.Sc)[1,2], Mohrekesh Haghighat M (M.Sc)[2], Dehghanpour M (B.Sc)[7]

[1]M.Sc in Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. [2]M.Sc in Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [3]Associate Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [4]Associate Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. [5]Veterinarian, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [6]M.Sc in Vaccine and Serum, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [7]B.Sc in Laboratory Sciences, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Abstract

Background and Objective: Iran remains a major stronghold for glanders in the Middle East. In Iran, the non-indigenous *Burkholderia mallei* Razi 325 strain is used in manufacturing of the mallein, required for malleination of animals. Multi Locus Variable number tandem repeat analysis is currently the standard globally accepted genotyping system for Burkholderia mallei. This study was done to survey the genomic structure of *Burkholderia mallei* Razi 325, the strain used for industrial production of Mallein.

Methods: In this descriptive study, a MLVA genotyping system with 4 previously-characterized loci VNTR140, VNTR1367, VNTR2065, VNTR2971 along with two new loci of VNTR24, VNTR41 was used.

Results: Optimization of PCRs resulted in a single protocol that enabled simultaneous amplification of all the six loci. Sequencing of PCR products revealed there were 2, 3, 12, 6, 1 and 2 copies of the unit repeat hold in the genome of the *Burkholderia mallei* Razi 325 strain. This observation was extended to include the already-whole genome sequenced Chinese *Burkholderia mallei* ATCC 23344 and *Burkholderia mallei* BMQ and also *Burkholderia mallei* SAVP1 strains.

Conclusion: The *Burkholderia mallei* Razi 325 strain is distinguishable from the other three strains through MLVA genotyping method.

Keywords: Glanders, Mallein, *Burkholderia mallei* Razi 325, MLVA genotyping, VNTR

*** Corresponding Author: Tadayon K (Ph.D), E-mail: k.tadayon@rvsri.ac.ir**

Received 25 Feb 2015 **Revised** 10 Aug 2015 **Accepted** 22 Aug 2015

Cite this article as: Faraj Tabrizi E, Tadayon K, Mosavari N, Tajbakhsh E, Keshavarz R, Ghaderi R, Sekhavati M, Banihashemi R, Najafpour R, Mohrekesh Haghighat M, Dehghanpour M. [Genomic structure of *Burkholderia mallei* Razi 325, the strain used for industrial production of Mallein in Iran]. J Gorgan Uni Med Sci. Autumn 2016; 18(3): 111-117. [Article in Persian]