DOI: 10.22092/VJ.2018.109903.1402
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

استفاده از یک سیستم VNTR بومی شده متکی بر دو لوکوس در دسته بندی ژنتیکی جدایه‌های صحرایی بورخولدریا مالئی در ایران

• شجاعت دشتی بور
گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، واحد تهران شرق، تهران، ایران
بخش توبرکولین PPD، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• کیوان تدین (نویسنده مسئول)
بخش واکسن های باکتریایی هوازی دامپزشکی،موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• نادر مصوری
بخش توبرکولین PPD، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• سید کاظم بیدوکی
گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، واحد تهران- شرق، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۹-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۰۷-۱۲-۱۳۹۶
Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

چکیده

بورخولدریا مالئی باکتری مسبب مشمشه با میزبان‌های عمدتا تک سمی خود سازگای یافته است و قادر به ادامه حیات طولانی در خارج از بدن میزبان نیست. ایران بصورت سالانه اپیدمی‌های این بیماری را تجربه می‌نماید. در سال‌های اخیر ژنوتایپینگ مبتنی بر لوکوس‌های چندگانه متشکل از واحدهای تکرارشونده پشت سرهم به عنوان روش انتخابی برای مشمشه پذیرفته شده است. با هدف ارزیابی مقایسه‌ای قدرت تفریق دو لوکوس VNTR به نام‌های VNTR1217 و VNTR13 تکنیک VNTR-PCR بر روی ۵ سویه بورخولدیا مالئی ایران اجرا گردید. توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR به منظور اطمینان از درستی اندازه و همچنین ساختار ژنتیکی تعیین گردید. ضمنا تعداد ۲۹ سویه بورخولدریا مالئی نیزدر تحقیق وارد شدند. نتایج نشان دادند همه سویه‌ها در ژنوم خود لوکوس VNTR13 را که در تحقیق حاضر معرفی گردید حمل می نمایند در حالیکه وجود لوکوس VNTR1217 در ژنوم ۴ سویه احراز نگردید. اندیکس Nei' di درمورد لوکوس VNTR13 بالاتر از VNTR1217 (۰,۸ در مقایسه با ۰,۷۴) تعیین گردید. تعداد آلل‌های شناخته شده توسط لوکوس‌های VNTR13 و VNTR1217 در میان سویه‌های ایران بترتیب ۲ و ۳ مورد بود. بر اساس این یافته ها اگر بنا بر انتخاب مجموعه ای از لوکوس های VNTR مناسب برای معرفی یک سیستم جهانی MLVA در مورد بورخولدریا مالئی وجود داشته باشد لازم است همه لوکوس‌های فعلی بر روی کلکسیونی از سویه‌های بورخولدریا مالئی از تمام جهان مورد آزمایش قرار گیرد. انجام چنین تحقیق گسترده‌ای تنها در صورت همکاری میان آزمایشگاه‌های مرجع مورد تایید OIE امکان پذیر خواهد بود.

کلمات کلیدی: بورخولدریا مالئی، VNTR، اپیدمیولوژی، ایران

● Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 51-58

A customized dual-locus VNTR combination for genotyping *Burkholderia mallei* field isolates in Iran

By: Dashtiboor, Sh., PPD Tuberculin Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.Tadayon, K., (Corresponding Author) Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mosavari, N., PPD Tuberculin Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Bidoki, S.K., Genetic & Biotechnology department, Faculty of Scinces, Payame Noor University, Tehran Shargh Branch; Thran, Iran.

Received: 2017-12-10 Accepted: 2018-02-26

Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Burkholderia mallei, the causative agent of Glanders, is a host-adapted bacterium that does not survive outside of its mostly soliped hosts. Iran is among those countries that experience annual outbreaks of the disease. Recently, multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) has achieved broad acceptance as the method of choice in genotyping of *B. mallei*. In order to comparative assessment of diversity indices provided by two tandem repeat loci namely VNTR1217 and VNTR13, five Iranian *B. mallei* strains were examined by VNTR-PCR. The amplification products were sequenced to guaranty accuracy of sizing and nucleotide structure of unit repeats. A further 29 *B. mallei* strains were also included in the study. As observed, all the 34 *B. mallei* strains carried the VNTR13 locus that was characterized by this study while VNTR1217 was missing in the genome of 4 studied strains. A higher Nei's diversity index (Nei' di=0.80) was presented by VNTR13 compared to that of VNTR1217 (Nei's di= 0.74) when MLVA applied on the whole panel of 34 strains. Among the Iranian strains, VNTR13 detected 3 alleles while VNTR1217 found two alleles. Findings of this study back the assumption that if a standard panel of VNTR loci are to be selected for a universal MLVA typing system suitable for *B. mallei,* all the reported loci from across the world are then expected to assess against a global collection of *B. mallei* strains. Such extensive investigation is possible only if an international collaboration between OIE-approved Glanders reference laboratories is set.

Key words: *Burkholderia mallei*, VNTR, epidemiology, Iran

مقدمه

بورخولدریا مالئی *(Burkholderia mallei)* عامل بیماری مشمشه در تک سمیان یک پاتوژن قادر به آلوده‌سازی میزبان‌های انسانی می‌باشد که از نظر جامعه جهانی به دلیل ویژگی‌های خاص نظیر توان انتقال از طریق تنفس، فقدان واکسن مناسب و مقاومت ذاتی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معاصر در فهرست ارگانیزم‌های درجه اول از نظر تسلیحات بیولوژیک قرار دارد (۲۲). در سال ۲۰۱۶ میلادی ایران مانند برخی دیگر از کشورهای خاورمیانه همچنان به عنوان یک کانون پایدار اندمیک مشمشه باقی ماند (۴). تعداد موارد شناسایی و گزارش شده سالانه مشمشه در گله‌های تک‌سمیان و دیگر میزبان‌های اتفاقی بورخولدریا مالئی (۱۰, ۲۰) در مقایسه با بیماری نظیر سل گاوی در ایران قابل توجه نیست اما بدلیل اهمیت این پاتوژن از دیدگاه کنوانسیون منع توسعه و تکثیر سلاح‌های بیولوژیک به عنوان یک عامل بیولوژیک مرگبار اعمال برنامه‌های تحت حمایت دولت در کنترل بیماری و کاهش خسارت‌های مربوط به آن به عنوان یک تکلیف قانونی کشورهای عضو سازمان بهداشت جهانی دام شناخته شده است. در اکتبر ۲۰۱۷ تعداد سویه‌های بورخولدریا مالئی که ژنوم آن‌ها بطور کامل تعیین توالی گردیده است به ۲۸ مورد (شامل ۱۰ سویه از ترکیه یک سویه از هندوستان (۸, ۹) و یک سویه از بحرین (۵)) بالغ گردید ضمن آنکه توالی غیر کامل ژنوم باکتری در ۳۶ سویه دیگر نیز بتدریج در اختیار عموم قرار گرفته است. بدین ترتیب با اضافه شدن دانش موجود بنظر می‌رسد زمان برای بازنگری و بروز رسانی پروتکل‌های سازمان بهداشت جهانی دام (OIE) در مورد مشمشه فرا رسیده باشد. در حال حاضر روش ژنتیکی معروف به Multiple Locus Variable number Tandem Repeat Analysis یا بطور خلاصه MLVA-VNTR که در سال ۲۰۰۹ میلادی در آمریکا (۲۳, ۲۴) توسعه یافت یک روش متعارف در تحقیقات مربوط به ژنتیک جمعیت بورخولدریا مالئی در آزمایشگاه‌های مرجع بین‌المللی شناخته

می‌شود. در این سیستم ژنوتایپینگ تفاوت میان اندازه ژنوم جدایه‌ها/ سویه‌های پاتوژن در لوکوس‌های متعدد که بصورت طبیعی در نتیجه تفاوت در تعداد قطعات معروف به واحدهای تکرار شونده (Tandem Repeat=TR) در هر لوکوس دیده می‌شود معیار تشخیص افتراقی میان جدایه‌ها/ سویه‌ها قرار می‌گیرد. در روش پیشنهادی U'Ren تعداد ۳۲ لوکوس بکار گرفته شدند. در سال‌های پس از آن لوکوس‌های دیگری نیز معرفی و بکار گرفته شده‌اند (۱۴, ۱۵). در مطالعه حاضر دو لوکوس جدید VNTR که در ژنوم بورخولدریا مالئی و همچنین بورخولدریا سودومالئی شناسایی شده‌اند معرفی و توانایی آن در کشف افتراق میان کلکسیونی از جدایه‌های ایرانی بورخولدریا مالئی بصورت آزمایشگاهی و در بین سویه‌های جهانی به کمک آنالیز با کامپیوتر (*in silico* analysis) مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جدایه (سویه)های بورخولدریا مالئی

به عنوان سویه استاندارد از *Burkholderia mallei* Razi 325 استفاده شد. این سویه آزمایشگاهی غیر بومی ایران پس از ورود به موسسه رازی کرج از آزمایشگاه همکار در سوئد در سال ۱۹۵۶ بصورت پیوسته در تولید انبوه آنتی‌ژن مالئین مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این سویه چهار جدایه صحرایی حاد بورخولدریا مالئی که در سال‌های اخیر از حیوانات مبتلا در استان‌های آذربایجان غربی (قاطر، اشنویه) اصفهان (اسب، سمیرم) البرز (اسب، کردان) و تهران (بیر، باغ وحش ارم) جداسازی و در آرشیو باکتری موسسه رازی نگهداری می‌گردند نیز در این تحقیق وارد گردیدند. هویت هر پنج باکتری با استفاده از پروتکل‌های مرسوم میکروبیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین ژنتیکی (آزمون Flip و آزمون Bim A) به عنوان بورخولدریا مالئی تأیید گردید.

بازیافت و تجدید کشت باکتری

میکروتیوب‌های محتوی چهار جدایه حاد همراه با سویه آزمایشگاهی تحت بررسی در محیط نگه دارنده TSB همراه با ۵۰ درصد گلیسیرین در فریزر ۷۵- درجه سانتی‌گراد، برداشت و در محیط آگار خون‌دار و همچنین ژلوز گلیسیرینه (آگار مغذی حاوی ۰,۰۰۵ گلیسیرین) تجدید کشت گردید و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

استخراج ژنوم باکتری

برای دستیابی به ماده ژنتیکی باکتری یك لوپ پلاستیکی (۱۰ میکرولیتر) کامل از کشت باکتری (محیط آگار خون‌دار) برداشت و به یک میکروتیوب مجهز به واشر ضد نشت (O-ring) محتوی µl ۴۰۰ بافر TB-lysis انتقال یافت. تیوب با استفاده از یك وزنه فلزی مناسب به مدت ۳۰ دقیقه در کف یک بن ماری حاوی آب در حال جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) استقرار یافت. پس از غیرفعال شدن باکتری میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در g ۸۷۰۰ سانتریفیوژ گردید و بخش مایع بالایی شناور در سطح که محتوی ژنوم باکتری بود برداشت و از فیلتر سرسرنگی µl ۰,۲ عبور داده شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایع بدست آمده بر روی یك پلیت محیط مغذی آگار خوندار کشت داده شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید تا از نظر رشد احتمالی باکتری مورد ارزیابی قرار گیرد. محلول‌های محتوی ماده ژنتیکی باکتری‌ها تا زمان مصرف در یخچال یا فریزر نگهداری شدند.

طراحی و ساخت پرایمر

فایل الکترونیکی ژنوم سویه (ATCC 23344) *Burkholderia mallei* شامل دو کروموزوم ۱ (کروموزوم بزرگ) و ۲ (کروموزوم کوچک) (قابل دسترسی از طریق مراجعه به https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_۰۰۰۰۱۱۷۰۵,۱) دریافت و با استفاده از برنامه Tandem repeat Finder و با اتکا بر تنظیمات پیش فرض مورد جستجو از نظر وجود واحدهای تکرار شونده قرار گرفت. اطلاعات خروجی این مرحله در قالب فایل Excel جمع آوری و بر اساس اندازه واحدهای تکرار شونده تعداد تکرارها در هر لوکوس میزان (درصد) همسانی میان توالی واحدهای تکرارشونده در هر لوکوس بصورت مستقل در مورد هر کروموزوم انجام پذیرفت. در مرحله بعد کلیه لوکوس‌های دارای واحدهای تکرارشونده کاملا یکسان (توالی نوکلئوتیها در همه واحدهای تکرار شونده پشت سرهم در یک لوکوس واحد کاملا یکسان می‌باشند) انتخاب گردیدند. با مراجعه به اطلاعات انتشار یافته پیشین معرفی احتمالی این لوکوس‌ها توسط محققین دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد وجود لوکوس‌های جدید در ژنوم سویه *B. mallei* ATCC23344 شناخته شده مورد بررسی قرار گرفت. پس از انتخاب لوکوس‌های مورد نظر موقعیت مکانی هر لوکوس مورد نظر با استفاده از برنامه Artemis (۱) در ژنوم هدف شناسایی گردید. در مرحله بعد یک قطعه ژنتیکی به طول حدود ۲ kb از ژنوم باکتری به گونه‌ای انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر بصورت تقریبی در میانه آن قرار گیرد. با هدف جستجو بدنبال بهترین زوج پرایمر PCR در طول قطعه انتخاب شده از برنامه Primer3 (۲۵) استفاده شد بطوری که اندازه مورد انتظار محصول PCR در محدوده ۷۰۰-۳۰۰ زوج باز قرار داشته باشد (جدول ۱).

آزمون‌های مولکولی

آزمون‌های Flip و Bim A بر اساس روش‌های متعارف موجود اجرا گردیدند (۱۵, ۱۹). دستیابی به بهترین پروتکل اجرای PCR در مورد MLVA-VNTR از نظر اجزاء واکنش و همچنین چرخه‌های آن بر اساس روش‌های موجود انجام پذیرفت (۱۹). بدین ترتیب در مورد آزمون‌های Flip و Bim A هر واکنش متشکل از ۸ میکرولیتر از DNA Master mix (Amplicon, Belgium)) ، ۰,۴ میکرولیتر از محلول کاری (۵ پیکو.مول در هر میکرولیتر) هریک از دو پرایمر پیشران و پسران همراه با ۱,۵ میکرولیتر نمونه ژنوم باکتری و ۵,۷ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر گردید. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله گرمایش مقدماتی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه تکراری مشتمل بر ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه ۶۵ درجه سانتی‌گراد (در مورد Bim A، ۵۶ درجه سانتی‌گراد) برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه گردید. در پایان یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه اعمال گردید.

در مورد آزمون های VNTR13 و VNTR1217 در هر واکنش ۱۵ میکرولیتر از DNA Master mix (Amplicon, Belgium)، ۱,۲ میکرولیتر از محلول کاری (۵ پیکومول در هر میکرولیتر) از پرایمرها پیشران و پسران همراه با ۳ میکرولیتر ماده ژنتیکی باکتری و ۸,۴ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر گردید. چرخه‌های PCR متشکل از یک مرحله گرمایش مقدماتی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه تکراری مشتمل بر ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه گردید. در پایان یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه اعمال گردید.

محصولات PCR با استفاده از ژل ۱ درصد آگاروز (Invitrogen®, USA) پیش رنگ شده با Red Safe ® به مدت ۲ ساعت در یک میدان الکتریکی به قدرت ۲ V/cm الکتروفورز و سپس در دستگاه ژل داك (BioRad®, USA) تصویر برداری گردیدند. از DNA size marker استاندارد شده ۱۰۰ bp برای تعیین تقریبی اندازه محصولات PCR استفاده گردید.

تعیین اندازه و توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR، تعیین شاخص تنوع ژنتیکی

به منظور تعیین دقیق اندازه و همچنین شناسایی ساختار ژنتیکی، همه محصولات آمپلیفیکاسیون در مورد همه جدایه‌ها و سویه تحت آزمون جهت تعیین توالی نوکلئوتیدها به آزمایشگاه همکار (Macrogen, South Korea) ارسال گردیدند. نتایج دریافت شده (فایل های

جدول ۱- لوکوس‌های VNTR و پرایمرهای PCR مورد استفاده در این تحقیق. اندازه محصول PCR و سویه های مربوط به هر محصول مشخص شده اند.

Locus	Amplicon size (base pair)								
VNTR۱۳	۴۱۱	۴۳۵	۴۴۷	۴۵۹	۴۷۱	۴۸۳	۵۰۷	۵۱۹	۵۵۵
Strains	BMQ, ATCC23344, Bahrain	SAP1	CP0078021، CP0005481, Oshna-vieh, Semirum, Tiger	India, Kordan	T1,T2,T3,T,325 4,T5,T6,T7,T8,T 9,T10	CP008704.1، 11، CP009148.1, JHU, FMH	,31063 ,10229 KC1092 ,34299	۳۴۳۰۶	۶
Primers	Primer f (5'→ 3'): GCA GAC AAA AGG GTA CGC AAT				Primer r (5'→ 3'): GGC AAC GCG CAC ATC AAG A				
Locus Properties	Unit Repeat: CGGCGAGGGAAA				Nei's diversity index: ۰,۸۰				

Locus	Amplicon size (base pair)						
VNTR۱۲۱۷	۶۱۹	۶۲۹	۶۳۹	۶۴۹	۶۶۹	۶۷۹	No PCR) ۰ (product
Strains	Kordan	,31063 ,11 ,10299 ,34299 CP0078021, CP0005481, KC1092	Bahrain, ,34306 CP010065.1	ATCC23344, T1,T2,T3,T4,T6,T7,T8,T9,T10, JHU, FMH, CP009148.1	India	SAVP۱	,CP010066.1 ,BMQ ,CP008711.1 ,CP008705.1 T5
Primers	Primer f (5'→ 3'): GAT CGC TTC GTG GTT CCG TT			Primer r (5'→ 3'): GCT CAC CGG ACA AAC GCT C			
Locus Properties	Unit Repeat: CGGACCTAGG			Nei's diversity index: ۰,۷۴			

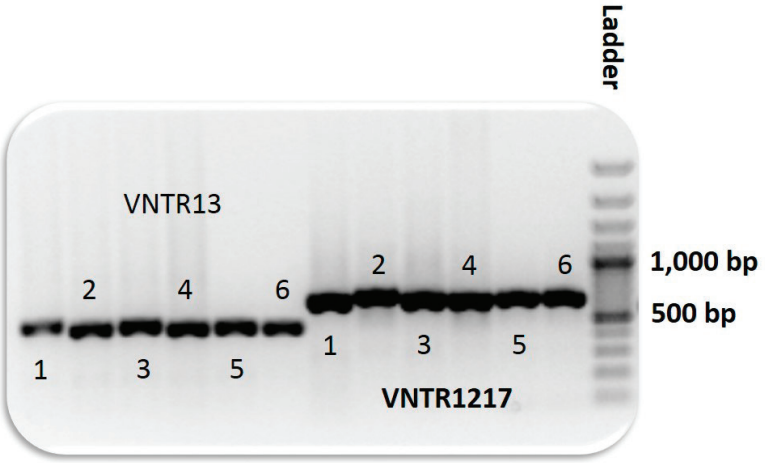
کروماتوگراف) با استفاده از نرم افزار Chromas بازنگری و پردازش و به کمک نرم افزار AliView (۱۱) با مناطق هم ارز از ژنوم سویه ATCC 23344 *Burkholderia mallei* مقایسه شد. محاسبه میزان تنوع ژنتیکی و قدرت تفریق هر یک از لوکوس‌های تحت آزمون با استفاده از شاخص Nei's diversity index و بر اساس فرمول ریاضی $\Sigma(\text{Allele}-1)^2$ صورت پذیرفت.

نتایج

در نتیجه اجرای آزمایش‌های بیوشمیایی هویت سویه و جدایه‌های تحت بررسی به عنوان بورخولدریا مالئی تایید گردید. در آزمون‌های مولکولی نیز با تولید یک قطعه به طول ۲۵۰ زوج باز در آزمون Bim A و قطعه دیگری به اندازه ۹۸۹ زوج باز در آزمون Flip یافته‌های آزمون‌ها بیوشیمایی مورد تایید قرار گرفت. جستجو بدنبال لوکوس‌های TR منجر به شناسایی تعداد قابل توجهی لوکوس در ژنوم سویه (ATCC) *Burkholderia mallei* (23344) گردید که از میان آنها لوکوسVNTR13 همراه با لوکوس VNTR 1217 با توجه به اندازه واحد تکرار شونده و تنوع در تعداد تکرارهای موجود در این لوکوس در میان ژنوم سویه‌های شناخته شده بین‌المللی برای بررسی بیشتر انتخاب گردیدند. واحدهای تکرارشونده در لوکوس VNTR13 شامل ۱۳ نوکلئوتید از قرار CGGCGAGGGAAA می‌باشند. دو زوج پرایمر به منظور تکثیر لوکوس VNTR13 و VNTR1217 طراحی گردیدند و با اعمال اصلاحات محدود واکنش‌های PCR بصورت موفقیت آمیز به گونه ای اجرا گردیدند که اجرای PCR هر دو لوکوس با استفاده از یک پروتکل مشترک فراهم گردید. در مورد لوکوس VNTR13 اندازه محصول PCR پس از تعیین توالی نوکلئوتیدها در جدایه های سمیرم، تهران و اشنویه برابر با ۴۴۷ زوج باز، در سویه کرج ۴۵۹ و در سویه رازی۴۷۱ زوج باز تعیین گردید (تصویر ۱). نتایج تعیین توالی محصولات PCR در مورد لوکوس VNTR1217 نشان داد اندازه این قطعه در جدایه های سمیرم، اشنویه، کرج و سویه Razi ۳۲۵ برابر ۶۱۹ و در جدایه تهران معادل ۶۴۹ زوج باز تعیین شد. محاسبه Nei's diversity index تنوع ژنتیکی لوکوس‌های VNTR13 و VNTR1217 در میان ۲۹ سویه شناخته شده بورخولدریا مالئی که ژنوم آنها بطور کامل شناخته شده است و ۵ سویه و جدایه تحت بررسی در این تحقیق میزان این شاخص را بترتیب ۰٫۸ و ۰٫۷۴ نشان داد (جدول ۱). در بررسی کامپیوتری (*in silico* analysis) نشانه هایی از حذف بخش یا بخش‌هایی از لوکوس VNTR1217 در ۵ سویه غیر ایرانی این باکتری شناسایی گردید.

بحث

در مطالعه حاضر از میان دو لوکوس VNTR1217 و VNTR13 مورد استفاده لوکوس VNTR13 بیش از این گزارش نگردیده است. یافته‌های آزمایشگاهی حاصل از تعیین توالی این لوکوس در میان سویه آزمایشگاهی و جدایه‌های صحرایی ایرانی موجود در موسسه رازی و همچنین تجزیه و تحلیل ژنوم ۳۰ سویه بورخولدریا مالئی با استفاده از نرم‌افزار نشان داد که تعداد ۹ آلل از این لوکوس در میان جمعیت تحت بررسی قابل شناسایی می‌باشد در مقایسه با لوکوس VNTR1217 تعداد آلل های قابل شناسایی محدود به ۷ مورد می باشد. در میان ۵ سویه و جدایه ایرانی تحت بررسی سه آلل شناسایی گردید. در بررسی مقایسه ای توان و قدرت تمایز میان این دو آلل، اندیکس Nei توان تفریقی بیشتری



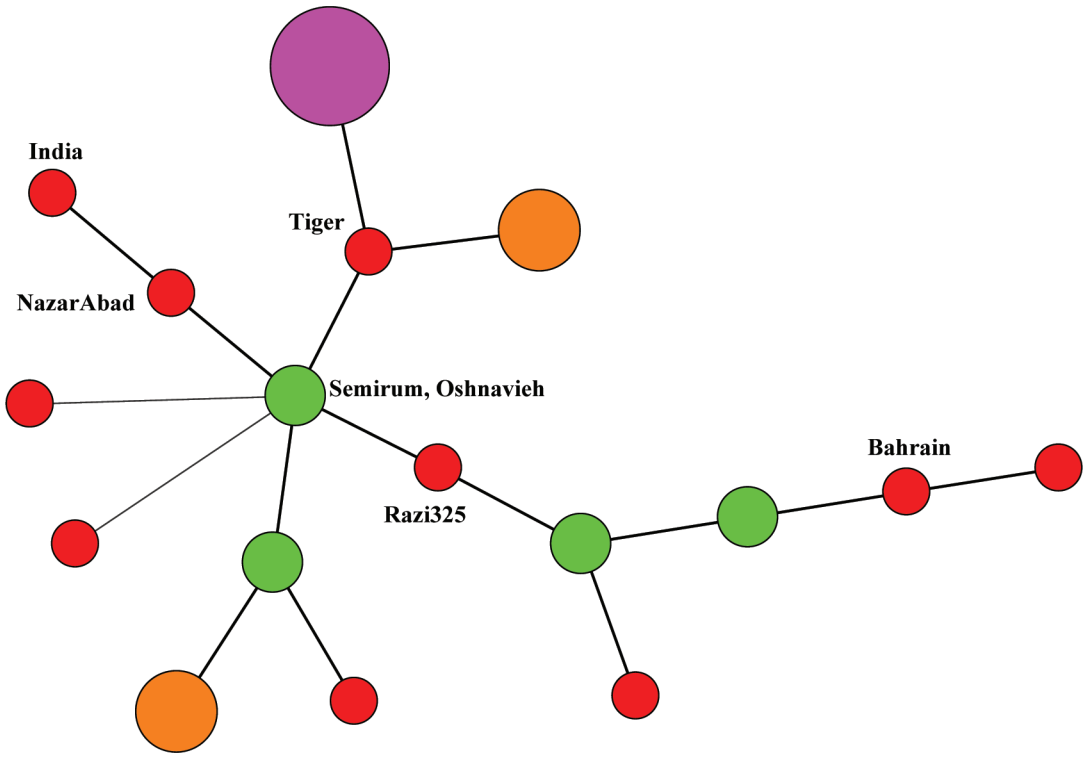
شکل ۱- یافته‌های p حاصل از اجرای VNTR-PCR با استفاده از لوکوس های VNTR13 و VNTR1217 بر روی سویه/جدایه های ایرانی بورخولدریا مالئی. DNA size marker مورد استفاده دارای باندهایی به فاصله ۱۰۰ bp می‌باشد. برای جزئیات به متن مراجعه شود.

را برای لوکوس VNTR13 نشان داد. در جریان دو مطالعه گذشته با استفاده از روش MLVA-VNTR بر روی جدایه‌های ایرانی لوکوس‌های VNTR۱۴۰، VNTR41، VNTR13 نتوانستند تمایزی میان جدایه‌های ایرانی نشان دهند (۱۵, ۱۹).

جستجوی نرم‌افزاری (*in silico*) بدنبال پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر برای تکثیر لوکوس VNTR1217 در ۵ سویه قادر به شناسایی موقعیت لوکوس نگردید. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده وقوع حذف بخش یا بخش‌هایی از این لوکوس در ژنوم سویه‌های تحت بررسی باشد. وقوع حذف ژنتیکی در لوکوس‌های VNTR پدیده‌ای است که پیش از این در میان بسیاری از باکتری‌های دیگر مشاهده و گزارش شده است.

همانگونه که در شکل ۲ نشان داده شده است جدایه‌های ایرانی بورخولدریا مالئی در درخت Minimum Spanning Tree که ارتباط ژنتیکی میان باکتری‌های تحت بررسی از نظر اپیدمیولوژی نشان می‌دهد در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند. با استناد بر یافته‌های تحقیق حاضر بدون در نظر گرفتن سویه خارجی و آزمایشگاهی Razi۳۲۵ دستکم ۳ گروه (کلون) از بورخولدریا مالئی در ایران فعالیت دارند در همین حال این باکتری‌ها به سویه‌های جدا شده از هندوستان و ترکیه در مقایسه با سویه جداشده از بحرین نزدیکتر بنظر می‌رسند. توسعه مطالعه حاضر از طریق افزایش تعداد لوکوس‌ها و همچنین کابرد روش‌های دیگر تایپینگ می‌تواند به بررسی دقیق‌تر این ارتباطات ژنتیکی کمک کند.

در حال حاضر مشمشه بطور عمده مشکل بهداشتی کشورهای توسعه نیافته و یا در حال توسعه می‌باشد که ضعف در تامین هزینه‌های اجرای برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی بیماری و همچنین فقدان امکانات آزمایشگاهی مناسب برای شناسایی عامل بیماری وجود دارد. بر همین اساس سازمان جهانی بهداشت دام (Office des Epizootis- OIE) در تدوین پروتکل‌های تشخیص (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) این بیماری استفاده از روش‌های جدیدتر مولکولی را تنها در آزمایشگاه‌های تخصصی پیشنهاد می‌نماید (۱۳). در حال حاضر تکنیک MLVA-VNTR جزو روش‌های مولکولی



شکل ۲- نمایش درخت ارتباطات متصور ژنتیکی (Minimum Spanning Tree) میان ۳۴ سویه بورخولدریا مالئی **بر اساس تیپ های ژنتیکی بدست آمده از MLVA typing بر مبنای لوکوس های VNTR13 و VNTR1217.دایره های قرمز رنگ تیپ هایی را نشان می دهند که تنها اختصاص به یک سویه دارند و دایره های سبز مربوط به تیپ هایی هستند که در دو سویه شناسایی شده اند. برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود**

مورد اشاره OIE در نسخه‌های راهنمای قدیمی‌تر منتشر شده پیش از سال ۲۰۰۹ میلادی در مورد مشمشه که شامل PCR-restriction fragment length polymorphism(۲۱)، pulsed field gel electrophoresis(۲)، ribotyping (۷) (or multilocus sequence typing (MLST (۶) می باشد، قرار ندارد. با اینحال این روش اکنون در همه آزمایشگاه‌های رفرانس مشمشه OIE در سرتاسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳, ۱۲, ۱۶-۱۸, ۲۴, ۲۶). بدلیل فقدان وجود یک آرشیو بین‌المللی از سویه‌ها و جدایه‌های جهانی که امکان ارزیابی همزمان فراوانی و تنوع ژنتیکی مرتبط با لوکوس‌های شناخته شده VNTR در این باکتری را فراهم نماید علیرغم فراوانی نسبی لوکوس‌های معرفی شده TR در ژنوم بورخولدریا مالئی، معرفی یک سیستم MLVA-VNTR بین‌المللی با تعداد محدودتری از این لوکوس‌ها فراهم نگردیده است. برهمین اساس شناسایی و استفاده از لوکوس‌هایی نظیر VNTR13 که در جمعیت‌های منطقه‌ای بورخولدریا مالئی نظیر ایران به عنوان کانون‌های فعال مشمشه از قدرت تفریقی قابل توجه برخوردار می‌باشند می‌تواند در توسعه و تعریف سیستم MLVA-VNTR بین‌المللی مورد تایید OIE سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط منابع مالی و امکانات آزمایشگاهی موجود در موسسه رازی کرج و بصورت پروژه تحقیقاتی ثبت شده شماره ۹۰۰۶۰-۱۸-۱۸-۲ مورد حمایت قرار گرفته است. شجاعت دشتی‌پور دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1- Carver T., S.R. Harris, T.D. Otto, M. Berriman, J. Parkhill and J.A. McQuillan. 2012. BamView: visualizing and interpretation of next-generation sequencing read alignments. *Briefings in bioinformatics* 14,203-212.

2- Chantratita N., M. Vesaratchavest, V. Wuthiekanun, R. Tiyawisutsri, T. Ulziitogtokh, E. Akcay, N.P. Day and S.J. Peacock. 2006. Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. *Am J Trop Med Hyg* 74,345-347.

3- Currie B.J., A. Haslem, T. Pearson, H. Hornstra, B. Leadem, M. Mayo, D. Gal, L. Ward, D. Godoy, B.G. Spratt and P. Keim. 2009. Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg Infect Dis* 15,169-174.

4- Elschner M.C., H. Neubauer and L.D. Sprague. 2017. The Resurrection of Glanders in a new Epidemiological Scenario: A Beneficiary of "Global Change". *Current Clinical Microbiology Reports* 4,54-60.

5- Elschner M.C., P. Thomas and F. Melzer. 2016. Complete Genome Sequence of a *Burkholderia mallei* Isolate Originating from a Glanderous Horse from the Kingdom of Bahrain. *Genome Announc* 4.

6- Godoy D., G. Randle, A.J. Simpson, D.M. Aanensen, T.L. Pitt, R. Kinoshita and B.G. Spratt. 2003. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J Clin Microbio*l 41,2068-2079.

7- Harvey S.P. and J.M. Minter. 2005. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS immunology and medical microbiology* 44,91-97.

8- Johnson S.L., K.A. Bishop-Lilly, J.T. Ladner, H.E. Daligault, K.W. Davenport, J. Jaissle, K.G. Frey, G.I. Koroleva, D.C. Bruce, S.R. Coyne, S.M. Broomall, N. Ketheesan, M. Mayo, A. Hoffmaster, M.G. Elrod, V. Wuthiekanun, A. Tuanyok, R. Norton, B.J. Currie, D.M. Wagner, P. Keim, P.E. Li, H. Teshima, H.S. Gibbons, G.F. Palacios, C.N. Rosenzweig, C.L. Redden, Y. Xu, T.D. Minogue and P.S. Chain. 2016. Correction for Johnson et al., Complete genome sequences for 59 Burkholderia isolates, both pathogenic and near neighbor. *Genome Announc* 4.

9- Johnson S.L., K.A. Bishop-Lilly, J.T. Ladner, H.E. Daligault, K.W. Davenport, J. Jaissle, K.G. Frey, G.I. Koroleva, D.C. Bruce, S.R. Coyne, S.M. Broomall, P.E. Li, H. Teshima, H.S. Gibbons, G.F. Palacios, C.N. Rosenzweig, C.L. Redden, Y. Xu, T.D. Minogue and P.S. Chain. 2015. Complete genome sequences for 59 burkholderia isolates, both pathogenic and near neighbor. *Genome Announc* 3.

10- Khaki P., N. Mosavari, N.S. Khajeh, M. Emam, M. Ahouran, S. Hashemi, M.M. Taheri, D. Jahanpeyma and S. Nikkhah. 2012. Glanders outbreak at Tehran Zoo, Iran. *Iranian journal of microbiology* 4,3-7.

11- Larsson A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* (Oxford, England) 30,3276-3278.

12- Lin Y., Q. Wu, X. Liu, S. Dong, L. Wu, H. Pei, K. Xu and Q. Xia. 2016. Molecular tracking investigation of melioidosis cases reveals regional endemicity in Hainan, China. *Biomed Rep* 5,766-770.

13- Malik P., H. Singha, S.K. Goyal, S.K. Khurana, B.N. Tripathi, A. Dutt, D. Singh, N. Sharma and S. Jain. 2015. Incidence of *Burkholderia mallei* infection among indigenous equines in India. *Veterinary record open* 2,e000129.

14- Michelle Wong Su Y., O. Lisanti, F. Thibault, S. Toh Su, K. Loh Gek, V. Hilaire, L. Jiali, H. Neubauer, G. Vergnaud and V. Ramisse. 2009. 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* 77,297-301.

15- Najafpour R., N. Mosavari, K. Tadayon and E. Tajbakhsh. 2015. Optimization of variable number tandem repeat (VNTR) analysis in the classical PCR machines for typing of *Burkholderia mallei*.

16- Price E.P., H.M. Hornstra, D. Limmathurotsakul, T.L. Max, D.S. Sarovich, A.J. Vogler, J.L. Dale, J.L. Ginther, B. Leadem, R.E. Colman, J.T. Foster, A. Tuanyok, D.M. Wagner, S.J. Peacock, T. Pearson and P. Keim. 2010. Within-host evolution of Burkholderia pseudomallei in four cases of acute melioidosis. *PLoS pathogens* 6,e1000725.

17- Scholz H.C., T. Pearson, H. Hornstra, M. Projahn, R. Terzioglu, R. Wernery, E. Georgi, J.M. Riehm, D.M. Wagner, P.S. Keim, M. Joseph, B. Johnson, J. Kinne, S. Jose, C.M. Hepp, A. Witte and U. Wernery. 2014. Genotyping of *Burkholderia mallei* from an outbreak of glanders in Bahrain suggests multiple introduction events. *PLoS Negl Trop Dis* 8,e3195.

18- Segonds C., M. Thouverez, A. Barthe, N. Bossuet-Greif, L. Tisseyre, P. Plesiat, G. Vergnaud, G. Chabanon and C. Pourcel. 2015. Development of a multiple-locus variable-number tandem-repeat typing scheme for genetic fingerprinting of Burkholderia cenocepacia and application to nationwide epidemiological analysis. *J Clin Microbiol* 53,398-409.

19- Tabrizi E., K. Tadayon, N. Mosavari, E. Tajbakhsh, R. Keshavarz, R. Ghaderi, M. Sekhavati, R. Banihashemi, R. Najafpour and M. Haghighat. 2016. Genomic structure of *Burkholderia mallei* Razi 325, the strain used for industrial production of Mallein in Iran. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 18.

20- Taghipour A., N.S.M. Khaje, M.S. Ghaazi, Z.S. Masoodi and H. Molookpour. 2011. First clinical report of the Glanders in Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*).

21- Tanpiboonsak S., A. Paemanee, S. Bunyarataphan and S. Tungpradabkul. 2004. PCR-RFLP based differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Molecular and cellular probes* 18,97-101.

22- Titball R.W., M.N. Burtnick, G.J. Bancroft and P. Brett. 2017. Burkholderia pseudomallei and *Burkholderia mallei* vaccines: Are we close to clinical trials? *Vaccine* 35,5981-5989.

23- U'Ren J M., H. Hornstra, T. Pearson, J.M. Schupp, B. Leadem, S. Georgia, R.W. Sermswan and P. Keim. 2007. Fine-scale genetic diversity among *Burkholderia pseudomallei* soil isolates in northeast Thailand. *Appl Environ Microbiol* 73,6678-6681.

24- U'Ren J.M., J.M. Schupp, T. Pearson, H. Hornstra, C.L. Friedman, K.L. Smith, R.R. Daugherty, S.D. Rhoton, B. Leadem, S. Georgia, M. Cardon, L.Y. Huynh, D. DeShazer, S.P. Harvey, R. Robison, D. Gal, M.J. Mayo, D. Wagner, B.J. Currie and P. Keim. 2007. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol* 7,23.

25- Untergasser A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J.A. Leunissen. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35,W71-74.

26- Zheng X., L.X. Wang, H. Wu, H. Chen, X. Zhu, J.R. He, L.X. Xia and W. Li. 2017. [Homology analysis and historical tracing for inter-continental Burkholderia pseudomallei strains of sequence type 562]. Zhonghua liu xing bing xue za zhi = *Zhonghua liuxingbingxue zazhi* 38,661-664.