DOI: 10.22092/VJ.2022.356486.1908
شماره ۱۳۷ زمستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

کاربرد سیستم تایپینگ MLVA 8 لوکوسی بر جدایه‌های بورکولدریا مالیای جمع‌آوری شده در ایران از سال ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۹، به روزرسانی جدید

• فرانک ابناءرودحله
دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• کیوان تدین (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
• نادر مصوری
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
• سید علی پوربخش
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
• محمود جمشیدیان
دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۸-۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۱۲-۰۳
Email: k.tadayon@gmail.com

چکیده

بورکولدریا مالیای با وجود سال‌های طولانی اجرای برنامه‌های تست و کشتار توسط کشورهای منطقه، همچنان تک‌سمیان در خاورمیانه و خاور دور را آلوده می‌نماید. در ایران نیز گزارشات موردی مشمشه و به صورت نادر موارد عفونت انسان مشاهده می‌گردد. تکنیک لوکوس‌های حامل واحدهای تکرار شونده پلی‌مرف در طول توانایی خود را در افتراق میان سویه‌های بورکولدریا مالیای ثابت نموده است. در مطالعه حاضر یک سیستم تایپینگ مولکولی سویه مشتمل بر ۸ لوکوس گزارش می‌گردد. این سیستم به صورت آزمایشگاهی بر روی ۶ جدایه بومی معرف جدیدترین همه‌گیری‌های مشمشه در ایران و یک سویه بورکولدریا مالیای اجرا گردید. علاوه بر این مجموعه‌ای از ژنوم ۲۰ سویه مرجع بورکولدریا مالیای و ۲ سویه بورکولدریا سودومالیای اخذ شده از بانک‌های اطلاعاتی Pubmed نیز در مطالعه وارد و به صورت رایانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. آلل‌های شناسایی شده از فقط ۱ مورد (لوکوس ۴۱) تا ۱۰ مورد (لوکوس ۱۳) متفاوت و مقادیر Nei's diversity index نیز از ۰٫۵۳ تا ۰٫۸۹ تعیین گردید. در مجموع ۲۷ جدایه تحت آزمایش توسط سیستم تایپینگ مورد استفاده در ۲۵ تیپ ژنتیکی و ۷ جدایه و سویه ایران در ۶ تیپ ژنتیکی دسته‌بندی شدند. نویسندگان معتقدند تا زمان اقتصادی شدن بسترهای تعیین توالی کامل ژنوم در آزمایشگاه‌های با بودجه محدود در کشورهای در حال توسعه، نسخه‌های بهینه MLVA نظیر آنچه در این مطالعه شرح داده شده است، می‌توانند در پیشبرد تحقیقات همه‌گیرشناسی بورکولدریا مالیای و آشکارسازی ارتباطات میان جدایه‌های آن در مقیاس محلی، منطقه‌ای و جهانی به خوبی موثر باشند.

کلمات کلیدی: بورکولدریا مالیای، مشمشه، MLVA

Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 74-82

Application of an 8-locus MLVA typing system on *Burkholderia mallei* isolates collected in Iran from 2012 to 2020, a fresh update

By:Abnaroodheleh, F., Veterinary Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tadayon, K.*, (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mosavari, N., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Pourbakhsh, S.A., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Jamshidian, M., Veterinary Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

Email: k.tadayon@gmail.com

Received: 2021-10-26 Accepted: 2022-02-22

Burkholderia mallei remains actively plaguing soliped populations across the Middle and Far East despite the long years of ongoing test and slaughter schemes run by the region States. This includes Iran with occasional reports of glanders and rarely-occurred cases of human infections. The Multiple locus Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA) has proved very effective in resolving of *Burkholderia mallei* strains. Here, a molecular strain-typing system based on 8 variable-number tandem-repeat (VNTR) loci is reported. This strategy was laboratory-tested on a panel of 6 indigenous isolates representing the most recent outbreaks of glanders in Iran and a single Swedish strain of *B. mallei*. A further collection of 20 *B. mallei* and 2 *B. pseudomallei* reference strains genomes obtained from Pubmed databases were also included in the study to conduct in-situ assessment. The number of alleles detected ranged from 1 (Locus 41) to 10 (locus) with the Nei's diversity index values ranged from 0.53 to 0.89. On the whole, the typing system designated 27 isolates into 25 genotypes and more specifically the 7 B mallei from Iran to 6 types. Authors believe by the time when the whole genome sequencing platforms have come economically available to the low-income laboratory settings in the developing world, the optimized versions of MLVA typing method such as the one described here deliver broad potential for epidemiological investigation of *B. mallei* and revelation of relationships between isolates at local, regional and worldwide scale.

Key words: *Burkholderia mallei*, Glanders, PCR-VNTR

مقدمه

مشمشه که Farcy، Malleus، Equinia و Glanders نیز نامیده می‌شود یک بیماری به شدت عفونی است که بیشتر با تظاهرات بالینی مشخصه آن یعنی ضایعات منجر به تشکیل زخم در پوست و غشاهای مخاطی شناخته می‌شود. این بیماری برای نخستین بار توسط یونانیان (۴۲۵-۴۵۰ پیش از میلاد) و سپس رومی‌ها (۵۰۰-۴۰۰ پس از میلاد) شرح داده شد (۲۱). این بیماری مشترک میان انسان و دام در بسیاری از موارد ابتلا انسانی حتی با وجود استفاده از رژیم درمانی مبتنی بر آنتی‌بیوتیک و مراقبت‌های پزشکی مناسب با مرگ بیمار همراه خواهد بود. گزارش وقوع بیماری به OIE جزو الزامات قانونی برای کشورهای عضو اعلام شده است (۷). تک‌سمیان و از جمله الاغ، قاطر و اسب مهم‌ترین میزبان‌های طبیعی بورکولدریا مالیای عامل ایجاد بیماری می‌باشند عفونت در الاغ بیشتر منجر به شکل حاد و در اسب به شکل مزمن منتهی می‌گردد، در حالی که بروز هر دو شکل حاد و مزمن و همچنین عفونت‌های پنهان در قاطر مشاهده می‌شود (۲۱). عامل بیماری یک باکتری گرم منفی بدون حرکت هوازی و یک پاتوژن درون سلولی است. همراه با کاهش اهمیت اقتصادی تک‌سمیان در حمل و نقل و اجرای برنامه تست و کشتار حیوانات آلوده، وقوع بیماری در مقیاس جهانی در یکصد سال اخیر رو به کاهش گذاشته است.

ویژگی‌های باکتریولوژیک این باکتری آن را به عنوان کاندید در تولید سلاح‌های زیستی و همچنین مباحث مربوط به مجمع منع توسعه و

تکثیر سلاح‌های بیولوژیک قرار داده است (۸). در آمریکا بورکولدریا مالیای به عنوان یک پاتوژن خطرناک در گروه Category B Bio-Threat agent بر اساس طبقه‌بندی CDC، قرار دارد (۱۴). در عمل و در جریان جنگ جهانی اول آلمان نسبت به استفاده نظامی از باسیل‌های بورکولدریا مالیای در بخارست رومانی (۱۹۱۶) و در آراس (Arras) فرانسه (۱۹۱۷) اقدام نمود (۶).

در شرایطی که در آمریکای شمالی و اروپای غربی بیماری ریشه‌کن شده محسوب می‌گردد، در آمریکای جنوبی، اروپای شرقی، خاور دور و البته خاورمیانه همچنان موارد دامی و انسانی بیماری مشاهده می‌شود (۱۵). در آسیا بیماری همچنان از نپال (۱)، هند (۱)، پاکستان (۱۷)، افغانستان (۱۷)، بنگلادش(۱۷)، عراق(۱۰)، کشورهای حاشیه جنوبی خلیج فارس (۱۵)، ترکیه (۴) و البته ایران گزارش می‌گردد (۳). در سال‌های اخیر همراه با وقوع موارد جدید مشمشه جدایه‌های بیشتری از بورکولدریا مالیای در موسسه رازی جداسازی و جمع‌آوری شده‌اند (۲، ۳، ۱۱ و ۱۸). در سال ۲۰۰۷ در امریکا یک سیستم ژنوتایپینگ وابسته به PCR مبتنی بر لوکوس‌های حامل واحدهای تکرارشونده پلی‌مرف در طول معروف به (Multi Locus Variable number of Tandem Repeat Analysis (MLVA معرفی گردید که به تدریج به روش بین‌المللی تایپینگ بورکولدریا مالیای تبدیل گردید. با این وجود با انجام مطالعات تکمیلی بعدی علیرغم قدرت تفریق زیاد نشان داده شد که برخی از لوکوس‌های پیشنهادی ممکن است در ژنوم برخی و یا حتی تعداد زیادی از جدایه‌های بورکولدریا مالیای وجود نداشته باشند (۲۲). این یافته‌ها سبب شده است که در مورد نوع و تعداد لوکوس‌های مورد استفاده در سیستم MLVA بین‌المللی اختلاف نظر وجود داشته باشد و اعمال سیستم MLVA و لوکوس‌های ژنتیکی مختلف بر روی جدایه‌های بیشتر پاتوژن در مطالعات همه‌گیر شناسی بین‌المللی مورد توجه قرار گیرد (۱۶). در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی و نیز وضعیت جمعیتی بورکولدریا مالیای یک روش MLVA با استفاده از ۸ لوکوس بر روی همه ۶ جدایه موجود در آرشیو موسسه رازی که تاکنون از تک سمیان ایران جداسازی گردیده‌اند، اجرا و یافته‌ها با اطلاعات سویه‌های مرجع بین‌المللی مقایسه و تحلیل گردیده‌اند.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد مطالعه

طی یک دوره ده‌ساله زیر نظر سازمان دامپزشکی کشور و در جریان عملیات ارزیابی صحرایی همه‌گیری‌های مشمشه در باغ وحش تهران (۱۳۸۹)، کردان در استان البرز (۱۳۹۱)، اشنویه در استان آذربایجان غربی (۱۳۹۳)، سمیرم در استان اصفهان (۱۳۹۶)، قم (۱۳۹۸) و کرمانشاه (۱۳۹۹)، اکیپ اعزامی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی نسبت به اخذ نمونه خون و سواپ از چشم، منخرین و همچنین زخم‌های جلدی از دام‌های مشکوک یا بیمار و بر حسب مورد انجام کالبدگشایی دام‌ها اقدام نمود. کشت میکروبی نمونه‌ها پس از انتقال آن‌ها به موسسه بر اساس روش مورد سفارش سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) انجام گرفت. انجام این اقدامات منجر به جمع‌آوری موفقیت‌آمیز ۶ جدایه بورکولدریا مالیای گردید که از آنها در انجام مطالعه حاضر استفاده گردید. علاوه بر این سویه سوئدی *Burkholderia mallei* Razi ۳۲۵ که از سال ۱۹۵۶ به آرشیو باکتریایی موسسه اضافه شده و از آن در تولید صنعتی آنتی‌ژن مالئین استفاده شده است نیز به عنوان سویه مرجع در این تحقیق وارد گردید.

بازیافت و تجدید کشت باکتری

در تابستان ۱۳۹۹ میکروفیوژتیوب‌های محتوی جدایه‌ها و سویه فوق (ذخیره شده در محیط نگه دارنده TSB/Glycerine) از آرشیو باکتریایی موجود در فریزر ۷۵- درجه سانتی‌گراد برداشت و بر روی لوله‌های کشت محیط ژلوز گلیسیرینه تجدید کشت و انکوبه (۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۴۸-۲۴ ساعت) گردید. با استفاده از آزمایشات ژنتیکی (PCR- fliP-IS۴۰۷A & PCR-BimA) هویت باکتری‌ها به عنوان بورکولدریا مالیای تایید مجدد گردید.

استخراج کروموزروم باکتری

از توده پرگنه‌های خالص باکتری (محیط ژلوز گلیسیرینه) معادل یک آنس کامل برداشت و به ۴۰۰ میکرولیتر بافر TB-lysis در یک میکروفیوژ تیوب انتقال یافت. تیوب به مدت ۲۰ دقیقه در عمق یک حمام آب گرم محتوی آب جوشان (۹۶ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد تا باکتری غیر فعال گردد. محتویات میکروتیوب سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه/ g۸۷۰۰) گردید و مایع شناور فوقانی محتوی کروموزوم باکتری برداشت گردید. معادل ۱۰ میکرولیتر از همین مایع روی یك پلیت آگار خوندار کشت و انکوبه گردید (۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت) تا از غیر فعال‌شدن باکتری اطمینان حاصل شود. سوسپانسیون محتوی ژنوم باکتری تا زمان انجام آزمایشات PCR در یخچال نگهداری شد.

ساخت پرایمر و آزمون‌های مولکولی وابسته به PCR

از ۸ زوج پرایمر معرفی شده پیشین استفاده شد (جدول ۱). این پرایمرها امکان تکثیر ۸ لوکوس VNTR مشتمل بر مناطق ۱۴۰، ۱۳۶۷، ۲۹۷۱، ۲۰۶۵ و ۱۲۱۷ از مجموعه لوکوس‌های معرفی شده در مطالعه U'Ren (۲۰) و همچنین لوکوس‌های ۴۱، ۲۴ و ۱۳ را که پیش از این در موسسه رازی شناسایی و معرفی شده‌اند (۲، ۱۳ و ۱۹) فراهم می‌نماید. واکنش‌های PCR به گونه‌ای تنظیم گردیدند که حجم همه آنها معادل ۱۲ میکرولیتر تنظیم گردید. اجزا تشکیل دهنده واکنش در مورد لوکوس‌های ۲۴ و ۱۳۶۷ و ۲۰۶۵ و ۲۹۷۱ شامل ۶ میکرولیتر (DNA Master mix Amplicon, Belgium)، ۰/۶ میکرولیتر DMSO، ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر پیشران و پسران (از محلول ۵ پیکامول/میکرولیتر)، ۰/۳۵ میکرولیتر محلول کلرور منیزیم (از محلول ۵۰ میلی‌مولار) همراه با ۲/۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ژنوم باکتری و ۱/۷۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر و در مورد لوکوس‌های ۱۳ و ۱۲۱۷ شامل ۶ میکرولیتر (DNA Master mix Amplicon, Belgium) ، ۰/۶ میکرولیتر DMSO، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر پیشران و پسران (از محلول ۵ پیکامول/میکرولیتر)، ۰/۳۵ میکرولیتر محلول کلرور منیزیم (از محلول ۵۰ میلی‌مولار) همراه با ۲/۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ژنوم باکتری و ۱/۵۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار و در مورد ۴۱ و ۱۴۰ شامل ۶ میکرولیتر (DNA Master mix (Amplicon, Belgium

، ۰/۶ میکرولیتر DMSO، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر پیشران و پسران (از محلول ۵ پیکامول/میکرولیتر)، ۰/۳۵ میکرولیتر محلول کلرور منیزیم(از محلول ۵۰ میلی‌مولار) همراه با ۲/۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ژنوم باکتری و ۲/۱۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر تقطیر، تنظیم گردید. برنامه حرارتی و زمانی PCR در مورد لوکوس‌های ۲۴ و ۱۳۶۷ و ۲۰۶۵ و ۲۹۷۱ شامل یک مرحله آغازین واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۳۰۰ s) و به دنبال آن ۷ چرخه تکراری مشتمل بر یک مرحله واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۶۰ s)، یک مرحله اتصال (۶۶ درجه سانتی‌گراد/۶۰ s)، یک مرحله طویل‌سازی (۷۲ درجه سانتی‌گراد/۶۰ s) و ۲۷ چرخه متعاقب تکراری مشتمل بر یک مرحله واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۳۰ s)، یک مرحله اتصال (۶۶ درجه سانتی‌گراد/۳۰ s) ، یک مرحله طویل‌سازی (۷۲ درجه سانتی‌گرادC/۳۰ s) و در نهایت یک مرحله نهایی تکمیلی طویل‌سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد/۶۰۰ s) گردید. در مورد لوکوس‌های ۱۳ و ۱۲۱۷ این چرخه شامل یک مرحله آغازین واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۳۰۰ s) و به دنبال آن ۳۵ چرخه تکراری مشتمل بر یک مرحله واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۳۰ s)، یک مرحله اتصال (۵۸ درجه سانتی‌گراد/۴۰ s)، یک مرحله طویل‌سازی (۷۲ درجه سانتی‌گراد/۶۰ s) و یک مرحله نهایی تکمیلی طویل‌سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد/۶۰۰ s) گردید. در مورد لوکوس‌های ۴۱ و ۱۴۰ چرخه شامل یک مرحله آغازین آغازین واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۳۰۰ s) و بدنبال آن ۳۵ چرخه تکراری مشتمل بر یک مرحله واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد/۳۰ s)، یک مرحله اتصال (۶۳ درجه سانتی‌گراد/۳۰ s)، یک مرحله طویل‌سازی (۷۲ درجه سانتی‌گراد/۳۰ s) و یک مرحله نهایی تکمیلی طویل‌سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد/۶۰۰ s) اجرا گردید. تعیین تقریبی اندازه طول محصولات PCR بروش متعارف الکتروفورز ژل پیش‌رنگ شده (Red Safe) آگاروز ۱٫۵٪ (USA) در میدان الکتریکی (۲ V/cm به مدت ۲ ساعت) و تصویربرداری مقایسه ای در دستگاه ژل داك (BioRad®, USA) با استفاده از DNA size marker صورت پذیرفت.

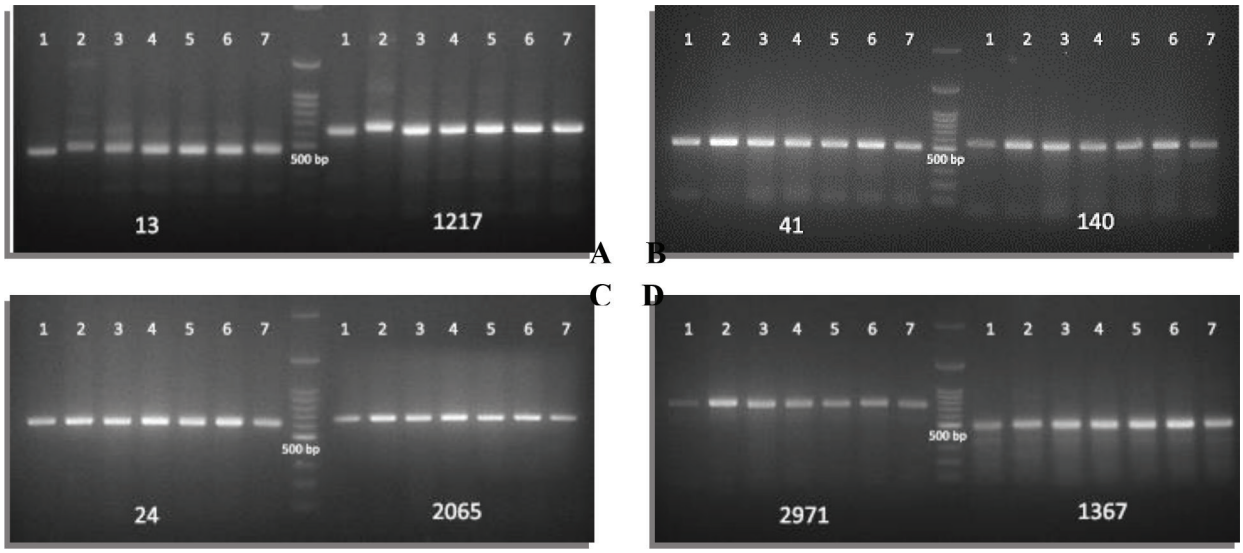
تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR

اندازه طولی دقیق محصولات تکثیر از طریق تعیین توالی نوکلئوتیدها صورت پذیرفت. نتایج در قالب فایل‌های الکترونیکی کروماتوگراف پس از دریافت با استفاده از نرم‌افزار Chromas بازنگری و در صورت لزوم اصلاح و پس از تبدیل به فایل‌های متنی ذخیره گردیدند. ژنوم ۲۲ سویه مرجع بورکولدریا مالیای از تارنمای (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/۴۷۷/) جمع‌آوری و قطعات هم ارز با استفاده از نرم‌افزار Artemis استخراج و بصورت فایل متنی (txt) ذخیره شدند. پس از تهیه فایل‌های متنی تلفیقی مشتمل بر قطعات ژنتیکی تعیین توالی شده و قطعات هم ارز از ژنوم سویه‌های مرجع بورکولدریا مالیای مرجع با استفاده از نرم‌افزار Clustal (۱۲) با مناطق هم ارز مقایسه شد.

تعیین شاخص تنوع ژنتیکی

قدرت تفریق هر یک از لوکوس‌های ۸ گانه مورد بررسی تحت آزمون با استفاده از شاخص Nei's diversity index و بر اساس فرمول ریاضی Σ^{-1} (Allele)) ۲ تعیین گردید (جدول ۱).

نتایج



شکل ۱- تکثیر موفقیت آمیز همه لوکوس‌های MLVA در ۷ جدایه و سویه مورد مطالعه در بررسی حاضر.

هویت جدایه‌ها و سویه بازیافت شده از آرشیو باکتریایی در نتیجه اجرای آزمایشات ژنتیکی (PCR- fliP-IS۴۰۷A & PCR-BimA) به عنوان بورکولدریا مالیای تایید گردید.

در آزمون‌های PCR تکثیر قطعات هدف در همه جدایه‌ها و سویه مورد بررسی با موفقیت انجام پذیرفت (شکل ۱) در حالی که تعیین توالی نوکلئوتیدها در مورد ۳ محصول PCR علیرغم تکرار آزمایش به دلیل کیفیت نامطلوب کروماتوگرام‌های محصول تعیین توالی امکان پذیر نگردید.

در آزمون MLVA در مجموع در میان باکتری‌های بورکولدریا مالیای موجود در موسسه رازی و سویه‌های منتخب تحت مطالعه در تحقیق حاضر در مورد لوکوس‌های ۱۴۰، ۱۳۶۷، ۲۹۷۱، ۲۰۶۵ و ۱۲۱۷ به ترتیب ۱، ۲، ۴، ۴ و ۲ آلل و در مورد لوکوس‌های ۴۱، ۲۴ و ۱۳ به ترتیب ۱، ۱ و ۳ آلل شناسایی گردید (جدول ۱).

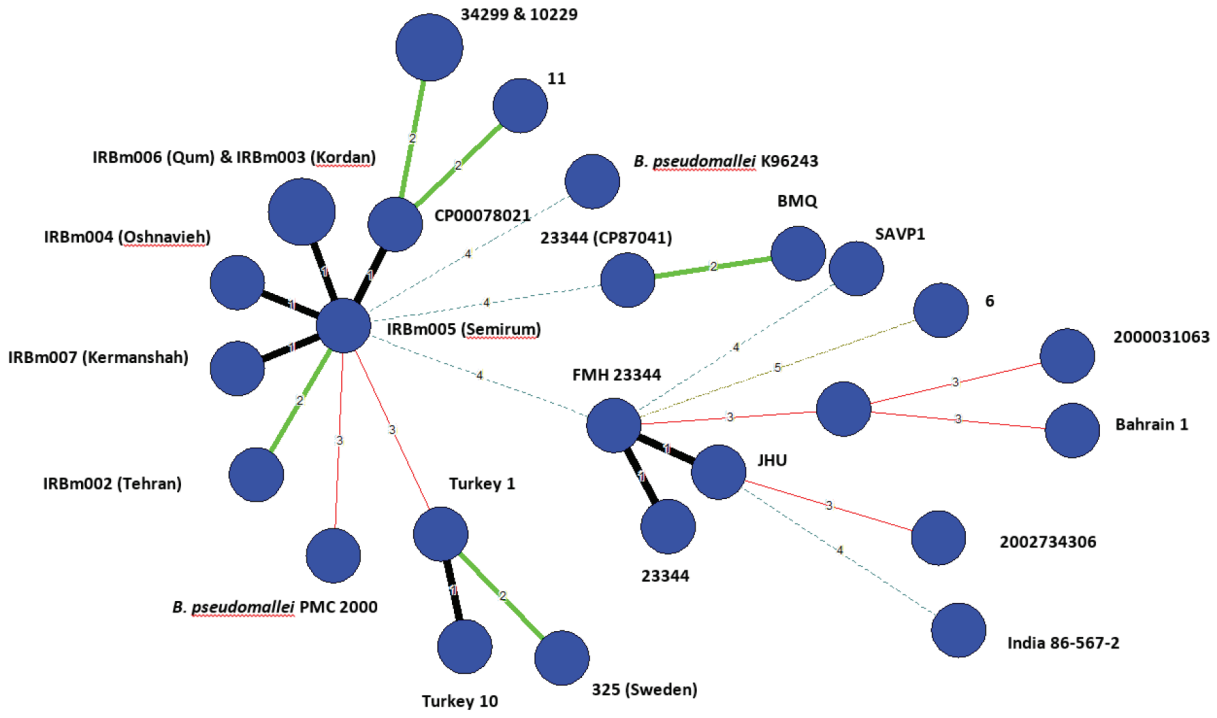
محاسبه شاخص Nei's diversity index تنوع ژنتیکی ۸ لوکوس به کار رفته در این تحقیق با شمول ۲۲ سویه شناخته شده بورکورلدریا مالیای که ژنوم آن‌ها به طور کامل تعیین توالی و اطلاعات آن در اختیار عموم قرار دارد در کنار جدایه‌ها و سویه تحت بررسی در این تحقیق به ترتیب ۰/۸۴، ۰/۵۵، ۰/۸۹، ۰/۵۴ و ۰/۸۴ در مورد لوکوس‌های ۱۴۰، ۱۳۶۷، ۲۹۷۱، ۲۰۶۵ و ۱۲۱۷ و ۰ ، ۰/۵۳ و ۰/۸۶ در مورد لوکوس‌های ۴۱، ۲۴ و ۱۳ محاسبه گردید (جدول ۱).

در بررسی مقایسه‌ای نرم‌افزاری (in silico analysis) نشانه‌هایی از حذف بخش یا بخش‌هایی از لوکوس VNTR۱۲۱۷ و VNTR۱۳۶۷ به ترتیب در ۳ و ۴ سویه غیر ایرانی این باکتری شناسایی گردید (جزئیات این یافته‌ها در متن حاضر ارائه نشده است).

نمودار Minimum spanning tree پروفایل‌های MLVA، ۶ جدایه بومی و ۱ سویه غیر بومی بورخولدریا مالیای ایران، ۱۸ سویه بین‌المللی بورخولدریا مالیای و ۲ سویه بین‌المللی بورکولدریا سودومالیای در شکل دو نشان داده شده است.

بحث

در میان ۸ لوکوس مورد استفاده در این تحقیق دو لوکوس ۱۳ و ۱۳۶۷ موفق به تشخیص افتراقی میان سویه Razi *Burkholderia mallei* ۳۲۵ و جدایه‌های ایرانی این باکتری شدند. به نظر می‌رسد این لوکوس‌ها پتانسیل کاربری به عنوان مارکرهای تشخیص تفریقی میان جدایه‌های بومی و غیر بومی ایران را داشته باشند که البته درستی این مشاهده با انجام مطالعات



شکل ۲- نمودار Minimum spanning tree پروفایلهایMLVA ۶ جدایه بومی و ۱ سویه غیر بومی بورخولدریا مالیای ایران، ۱۸ سویه بین‌المللی بورخولدریا مالیای و ۲ سویه بین المللی بورکولدریا سودومالیای. هر دایره نشان دهنده یک پروفایل ژنتیکی می‌باشد و اندازه هر دایره با تعداد جدایه/سویه های معرف آن پروفایل متناسب است. اعداد کنار خطوط متصل کننده میان دایره‌ها نشان‌دهنده عددی تفاوت میان پروفایل‌های MLVAو تفاوت در اندازه لوکوس‌ها می‌باشد.

	Isolate/Strain ID	Host	Origin	Year of isolation/ introduction	۱۳	۲۴	۴۱	۱۴۰	۱۲۱۷	۱۳۶۷	۲۰۶۵	۲۹۷۱
B	IRBm۰۰۱ (۳۲۵)	ND	Sweden	۱۹۵۹	۴۷۱	۶۰۴	۵۰۹	۵۶۳	۶۱۹	۵۰۴	۶۷۴	۷۴۱
	IRBm۰۰۲	Tiger	Iran (Tehran)	۲۰۱۰	۴۴۷	۶۰۴	۵۰۹	۵۶۳	۶۴۹	۴۹۵	۶۶۶	۷۳۴
	IRBm۰۰۳	Horse (mare)	Iran (Kordan)	۲۰۱۲	۴۵۹	۶۰۴	۵۰۹	۵۶۳	۶۱۹	۴۹۵	۶۲۶	۷۲۷
	IRBm۰۰۴	Horse	Iran (Oshnavieh)	۲۰۱۴	۴۴۷	۶۰۴	۵۰۹	۵۶۳	۶۱۹	۴۹۵	۶۵۸	۷۲۷
	IRBm۰۰۵	Horse (mare)	Iran (Semirum)	۲۰۱۹	۴۴۷	۶۰۴	۵۰۹	۵۶۳	۶۱۹	۴۹۵	۶۲۶	ND
	IRBm۰۰۶	Horse (stallion)	Iran (Qum)	۲۰۲۰	۴۵۹	۶۰۴	۵۰۹	۵۶۳	۶۱۹	۴۹۵	□□	۷۲۷
	IRBm۰۰۷	Horse	Iran (Kermanshah)	۲۰۲۱	۴۴۷	۶۰۴	۵۰۹	۵۶۳	۶۱۹	۴۹۵	۶۵۸	۷۳۴

جدول ۱- جزئیات مربوط به (A لوکوس‌های MLVA مورد استفاده در این تحقیق، پرایمرهای بکار رفته در تکثیر مناطق ژنتیکی محتوی این لوکوس‌ها، اندازه واحدهای تکرار شونده، تعداد آلل‌های مشاهده شده هر لوکوس در میان سویه‌ها و جدایه‌های بورخولدریا مالیای و سودومالیای مورد مطالعه و قدرت تفریق هر لوکوس؛ (B جدایه‌ها و سویه بورخولدریا مالیای موجود در ایران مورد استفاده در این تحقیق و ویژگی‌های ژنتیکی هر یک از لوکوس‌های هدف در ژنوم آنها.

	Locus	Primer sequence (۵'→۳')	Unit Repeat	No. of alleles	Tandem Repeat Copy No.	PCR Product size (bp)	Nei's Diversity index
A	۱۳	F) GCAGACAAAAGGGTACGCAAT R) GGCAACGCGCACATCAAGA	۱۲	۱۰	۲,۷, ۴,۷, ۵,۷, ۶,۷, ۷,۷, ۸,۷, ۹,۷, ۱۰,۷, ۱۱,۷, ۱۴,۷	۴۱۱, ۴۳۵, ۴۴۷, ۴۵۹, ۴۷۱, ۴۸۳, ۴۹۵, ۵۰۷, ۵۱۹, ۵۵۵	۰,۸۶
	۲۴	F) TTCTCGAATCGCCCTTCAC R) CGGTGTTTTCGGTGCATCTG	۲۴	۴	۱,۲, ۱,۳, ۱,۴, ۱,۵	۶۰۴, ۶۲۸, ۶۵۲, ۶۷۶	۰,۵۳
	۴۱	F) ATGAGCTTCTGCCCATCGAC R) GTTGGGAATAGAACGGCGTG	۷	۱	۱۲,۱	۵۰۹	۰
	۱۴۰	F) GTCGGGCATTCCGTTCAGA R) AACGGGAAGGGCGAGTCT	۸	۴	۲, ۳, ۱۵, ۳۶	۵۶۳, ۵۷۱, ۶۶۷, ۸۳۵	۰,۵۵
	۱۲۱۷	F) GATCGCTTCGTGGTTCCGTT R) GCTCACCGGACAAACGCTC	۱۰	۹	۰, ۱,۴, ۱,۵, ۱,۶, ۱,۷, ۱,۸, ۹,۱۰, ۱۱,۹, ۱۵,۱	۰, ۶۰۹, ۶۱۹, ۶۲۹, ۶۳۹, ۶۴۹, ۶۶۹, ۶۷۹, ۷۱۶	۰,۸۴
	۱۳۶۷	F) GGCGCTGCCGTGGCCGGACGAC R) GCCGGCGAAGCATCGAGGCGG	۹	۸	۰, ۲,۸, ۲,۹, ۲,۱۰, ۲,۱۱, ۲,۱۲, ۲,۲۲, ۲,۲۴	۰, ۴۶۸, ۴۷۷, ۴۸۶, ۴۹۵, ۵۰۴, ۵۹۴, ۶۱۲	۰,۸۴
	۲۰۶۵	F) GGAAGTCCCCGAGTGAACTG R) GTTACGACTTCTCCGGGCAT	۸	۶	۵,۵, ۵,۷, ۵,۸, ۵,۹, ۵,۱۰, ۵,۱۱	۶۲۶, ۶۴۲, ۶۵۰, ۶۵۸, ۶۶۶, ۶۷۴	۰,۵۴
	۲۹۷۱	F) AACGACGGTGTGGTTTTCA R) CAACACGCTCGTCTACCTGA	۷	۹	۱,۱۳, ۲,۱۳, ۳,۱۳, ۳,۱۴, ۶,۱۴, ۳,۱۵, ۳,۱۶, ۳,۱۷, ۷,۱۹	۷۱۵, ۷۱۸, ۷۲۰, ۷۲۷, ۷۳۲, ۷۳۴, ۷۴۱, ۷۴۸, ۷۸۱	۰,۸۹

آتی و شمول جدایه‌های بیشتر ایرانی ارزیابی خواهد گردید.
در بررسی مقایسه‌ای میان قدرت تفریقی ۸ لوکس بکار رفته در این مطالعه لوکوس‌های ۲۴، ۱۴۰ در ژنوم تمام جدایه‌های ایرانی و لوکوس ۴۱ در میان همه جدایه‌ها و سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق بدون پلی‌مرفیسم مشاهده گردیدند که بدین ترتیب استفاده از لوکوس ۴۱ در روش ژنوتایپینگ MLVA بورکولدریا مالیای نمی‌تواند سودمند باشد. در عین حال لوکوس ۱۳ ضمن ارایه بیشترین میزان تعداد آللها (۱۰) در میان باکتری‌های تحت آزمون به عنوان دومین لوکوس قدرتمند از نظر قدرت تفریق ظاهر گردید. به نظر می‌رسد این لوکوس می‌تواند به عنوان یک کاندید در معرفی نسخه اصلاح شده روش ژنوتایپینگ MLVA بورکولدریا مالیای در مقیاس بین‌المللی در نظر گرفته شود.
استفاده از روش ژنوتایپینگ MLVA با بکار گیری ۸ لوکوس مورد نظر این مطالعه هفت جدایه ایرانی و سویه سوئدی موجود در موسسه رازی را در هفت پروفایل ژنتیکی تفکیک نمود که می‌تواند نشانه‌ای قابل اعتماد از وجود تنوع قابل توجه ژنتیکی در جمعیت بورکولدریا مالیای و کانون‌های متعدد حضور و فعالیت باکتری در ایران باشد (۹).
در ارزیابی مقایسه‌ای جدایه‌های ایرانی با ۳۰ جدایه بین‌المللی از کشورهای دیگر و تحلیل ارتباط ژنتیکی میان باکتری‌های تحت بررسی از نظر همه‌گیرشناسی همان گونه که در شکل ۲ نمایش داده شده است جدایه‌های ایرانی با یکدیگر مشابهت ژنتیکی بیشتری دارند. این مشاهده می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که جدایه‌های ایرانی احتمالاً از نظر تکاملی از یک کلون اجدادی اشتقاق یافته و سپس به تدریج در این نواحی جغرافیایی انتشار یافته‌اند (۹).
مشاهده تیپ‌های ژنتیکی متعدد در میان تعداد محدود جدایه‌های ایرانی تحت مطالعه در این تحقیق ضمن اشاره بر گستردگی تنوع ژنتیکی جمعیت باکتری در ایران می‌تواند نشانه‌ای از موفقیت سیاست‌های بکار گرفته شده مدیریتی در مهار موارد وقوع بیماری در میان جمعیت‌های تک‌سمیان و محدود نگه داشتن دامنه همه‌گیری به موارد تک‌گیر باشد که در عین حال نشان‌دهنده ماندگاری و حرکت بیماری در نتیجه معرفی تک‌سمیان جدید آلوده و حامل باکتری به گله خواهد بود (۱۶). این مشاهده پیش از این به عنوان پدیده رایج عامل پایداری مشمشه در منطقه خاورمیانه معرفی شده است (۵ و ۹).
در جمع‌بندی یافته‌ها، اعمال سیستم تایپینگ ژنتیکی MLVA در دسته‌بندی جدایه‌های بورکولدریا مالیای و تشخیص نشانه‌های وجود زنجیره‌های احتمالی انتقال عفونت و موارد وقوع مشمشه در گله‌های تک‌سمیان می‌تواند کاربردی و سودمند باشد و با شمول جدایه‌های بیشتر یافته‌های این سیستم تحلیل دقیقتری از ارتباطات همه‌گیری میان موارد وقوع بیماری در ایران قابل استنتاج خواهد بود.

تشکر و قدردانی

امکانات و هزینه‌های عملیات آزمایشگاهی و صحرایی اجرای این مطالعه و همچنین جدایه‌ها و سویه باکتریایی مورد استفاده در قالب پروژه تحقیقاتی شماره ۰۱-۱۸-۱۸-۰۵۴-۹۷۰۱۷ توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی فراهم شده است. از آقای رضا نجف‌پور، شجاعت دشتی‌پور و علی دهقان‌پور به خاطر مساعدت در انجام عملیات بازیافت، کشت و استخراج ژنوم باکتری تقدیر می‌گردد. فرانک ابنا رودحله دانش آموخته دکترای تخصصی میکروبیولوژی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Acharya, K. P., S. Marahatta and R. T. Wilson. 2021. First outbreak of glanders in Nepal and possible implications for the animal sector. Wiley Online Library.
2. Dashtipoor, S., K. Tadayon, N. Mosavari and S. K. Bidouki. 2018. A customized dual-locus VNTR combination for genotyping Burkholderia mallei field isolates in Iran. *Veterinary Researches & Biological Products* 31: 51-58.
3. Dashtipour SH., Keyvan Tadayon, Sajjad Yazdansetad, Nader Mosavari and R. Keshavarz. 2021. Genomic pattern analysis of Burkholderia mallei field isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) discriminatory typing. *Iranian journal of microbiology* 13: 574-582.
4. Ellis, P. 2020. Glanders: re-emergence of an ancient zoonosis. *Microbiology Australia* 41: 41-44.
5. Erdemsurakh, O. 2020. Pathological and epidemiological studies on equine glanders in Mongolia.
6. Ewin, T. 2020. Modern resonances of Imperial Germany's biological-warfare sabotage campaign, 1915–18. *The Nonproliferation Review* 27: 277-287.
7. Falcão, M. V. D., P. P. Silveira, V. L. Santana, L. O. da Rocha, K. P. Chaves and R. A. Mota. 2019. First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from glanderous horses from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 50: 1125-1127.
8. Hayoun, M. A. and K. C. King. Section. 2020. Biologic Warfare Agent Toxicity. StatPearls. Treasure Island (FL).
9. Hornstra, H., T. Pearson, S. Georgia, A. Liguori, J. Dale, E. Price, M. O'Neill, D. Deshazer, G. Muhammad, M. Saqib, A. Naureen and P. Keim. 2009. Molecular epidemiology of glanders, *Pakistan. Emerging Infectious Diseases* 15: 2036-2039.
10. Hussein, Z. S. 2018. Detection of Glanders in horses of eight Iraqi provinces by ELISA. *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences* 11: 21-25.
11. 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.
12. Larsson, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. Bioinformatics 30: 3276-3278.
13. 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*.

14. Scholz, H. C., T. Pearson, H. Hornstra, M. Projahn, R. Terzioglu, R. Wernery, E. Georgi, J. M. Riehm, D. M. Wagner and P. S. Keim. 2014. Genotyping of *Burkholderia mallei* from an outbreak of glanders in Bahrain suggests multiple introduction events. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8: e3195.

15. Shanmugasundaram, K., H. Singha, S. Saini and B. N. Tripathi. 2022. 16S rDNA and ITS Sequence Diversity of Burkholderia mallei Isolated from Glanders-Affected Horses and Mules in India (2013–2019). *Current microbiology* 79: 1-13.

16. Singha, H., M. C. Elschner, P. Malik, S. Saini, B. N. Tripathi, K. Mertens-Scholz, H. Brangsch, F. Melzer, R. K. Singh and H. Neubauer. 2021. Molecular Typing of *Burkholderia mallei* Isolates from Equids with Glanders, India. *EmergingInfectious Diseases* 27: 1745

17. Singha, H., F. Vorimore, S. Saini, T. Deshayes, M. Saqib, B. Tripathi and K. Laroucau. 2021. Molecular epidemiology of *Burkholderia mallei* isolates from India (2015–2016): New SNP markers for strain tracing. *Infection, Genetics and Evolution* 95: 105059.

18. 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.

19. Tabrizi, E. F., K. Tadayon, N. Mosavari, E. Tajbakhsh, R. Keshavarz, R. Ghaderi, M. Sekhavati, R. Banihashemi, R. Najafpour and M. 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. U'Ren, J. M., J. M. Schupp, T. Pearson, H. Hornstra, C. L. C. Friedman, K. L. Smith, R. R. L. Daugherty, S. D. Rhoton, B. Leadem and S. Georgia. 2007. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC microbiology* 7: 1-20.

21. Van Zandt, K. E., M. T. Greer and H. C. Gelhaus. 2013. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet journal of rare diseases* 8: 131.

22. Yen, M. W. S., O. Lisanti, F. Thibault, T. S. San, L. G. Kee, 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. *Journal of Microbiological Methods* 77: 297-301.