

## تحقیقی

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

لیکا فوج تبریزی<sup>۱</sup>، دکتر کیوان تدین\*<sup>۲</sup>، دکتر نادر مصوری<sup>۳</sup>، دکتر الهه تاجبخش<sup>۴</sup>، دکتر روح اله کشاورز<sup>۵</sup>، دکتر رایناک قادری<sup>۶</sup>  
محمد سخاوتی<sup>۱</sup>، رضا بنی هاشمی<sup>۱</sup>، رضا نجف پور<sup>۱</sup>، مریم مهره کش حقیقت<sup>۱</sup>، مهدی دهقان پور<sup>۲</sup>

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. ۴- دانشیار، میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. ۵- دامپزشک و کارشناس ارشد واکسن و سرم، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ۶- 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 باقی مانده مهم مسمشه در خاورمیانه است و برای انجام آزمایش مالئیناسیون و شناسایی دام‌های مبتلا به مسمشه و یا آلوده از سویه غیربومی *Burkholderia mallei* Razi 325 برای تولید مالئین استفاده می‌گردد. روش ژنوتایپینگ *Multi Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)* به عنوان روش بین‌المللی تایپینگ بورخولدریا مالئی پذیرفته شده است. 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 استفاده از ۴ لوکوس شناخته شده *VNTR140*، *VNTR1367*، *VNTR2065* و *VNTR2971* و ۲ لوکوس جدید *VNTR24* و *VNTR41* استفاده گردید. یافته‌ها: نتیجه با بهینه‌سازی فرآیند *PCR* انجام آمپلیفیکاسیون هر ۶ منطقه ژنتیکی به صورت همزمان توسط یک پروتکل مقدر گردید. محصولات آمپلیفیکاسیون تعیین توالی شدند. در ژنوم این سویه در لوکوس‌های *VNTR140*، *VNTR1367*، *VNTR2065*، *VNTR2971* و *VNTR24* به ترتیب ۲، ۳، ۱۲، ۶، ۱ و ۲ کپی از واحدهای تکرار شونده خاص هر لوکوس وجود داشت. این ساختار ژنتیکی با آنچه از سویه چینی *Burkholderia mallei* ATCC 23344 و سویه‌های *Burkholderia mallei* BMQ و *Burkholderia mallei* SAVPI 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:** مسمشه، مالئین، بورخولدریا مالئی *Razi 325*، ژنوتایپینگ *MLVA*، *VNTR*

\* نویسنده مسؤول: دکتر کیوان تدین، پست الکترونیکی [k.tadayon@rvrsi.ac.ir](mailto:k.tadayon@rvrsi.ac.ir)

نشانی: کرج، حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کدپستی ۳۱۹۷۶۱۹۷۵۱، تلفن ۰۲۶-۳۴۵۰۲۸۹۲، نامبر ۳۴۵۵۲۱۹۴  
وصول مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۶، اصلاح نهایی: ۱۳۹۴/۵/۱۹، پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۳۱

## مقدمه

میلادی به وجود بیماری در تک سمی‌های ایران اشاره نموده است (۸). وقوع اپیدمی مسمشه در سال ۱۳۸۹ در میان شیر و بربهای باغ وحش تهران از جدیدترین موارد بیماری است که در نتیجه آن چندین قلاده از گرانبهاترین گونه‌های کمیاب این گربه‌سانان تلف و یا نابار ملاحظاتی قرنطینه به ناچار معدوم شدند (۶). در جنس بورخولدریا بیش از ۴۳ گونه مستقل شناسایی و تعریف شده است (۹ و ۱۰). در این میان بورخولدریا مالئی و بورخولدریا سودومالئی (عامل *Melioidosis*) به عنوان دو گونه بسیار نزدیک از نظر خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی و همچنین تظاهرات بیماری ایجاد شده در انسان و دام بیمار شناخته می‌شوند (۱۱).

قدیمی‌ترین توضیحات مستند در مورد مسمشه (*Glanders*) توسط بقراط و ارسطو در سال‌های ۴۲۵ و ۳۵۰ قبل از میلاد مسیح ارائه شده است (۱). با این حال شناسایی و جداسازی بورخولدریا مالئی به عنوان عامل بیماری تا پیش از سال ۱۸۸۲ ممکن نگردید (۲). در حال حاضر وقوع طبیعی مسمشه از نظر جغرافیایی محدود به بخش‌هایی از آسیا (۴۳)، خاورمیانه (۶۵)، آفریقا و نیز آمریکای جنوبی (۷ و ۲) می‌گردد. ایران همچنان یکی از کانون‌های اصلی اندمیک بیماری در غرب آسیا محسوب می‌گردد (۶). جوزف دزیره تولوزانی، پزشک فرانسوی ناصرالدین شاه در قرن نوزدهم

### 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 بن ماری محتوی آب در حال جوش (۹۵ درجه سانتی گراد) استقرار یافت و به مدت ۳۰ دقیقه در همین وضعیت نگه داشته شد تا باکتری غیرفعال گردد. سپس میکروتیوب به خارج از بن ماری انتقال یافت و پس از خنک شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی به دست آمده محتوی ژنوم باکتری با دقت برداشته شد و از فیلتر سرسنگی 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 به صورت مستقیم در واکنش های PCR به کار گرفته شد.

### آزمون MLVA

#### انتخاب لوکوس های VNTR

از مجموع ۶ لوکوس VNTR مورد استفاده در این مطالعه ۴ لوکوس بر اساس مطالعه U'Ren (۱۲) انتخاب شدند. لوکوس ها شامل VNTR140، VNTR1367، VNTR2065 و VNTR2971 بودند. لوکوس های VNTR2065 و VNTR1367 بر روی کروموزوم کوچک و لوکوس های VNTR2971 و VNTR140 بر روی کروموزوم بزرگ باکتری استقرار دارند. انتخاب این ۴ لوکوس بر اساس میزان پلی مورفیسم مشاهده شده متناسب به آنها صورت پذیرفت که به اصطلاح Nei's Diversity Index شناخته می شود (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 نرم افزار Tandem Repeat Finder ver و با استفاده از مؤلفه های پیش فرض نرم افزار مورد جستجو قرار گرفت. بدین ترتیب لوکوس های 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 لوکوس ها از جمله VNTR24، VNTR2065، VNTR2971، VNTR41 و VNTR140 با استفاده از نرم افزار آرتمیس بخشی از ژنوم باکتری به طول تقریبی 2 Kb به گونه ای انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر

روش ژنوتایپینگ وابسته به PCR به نام MLVA (Multi locus Variable Number Tandem Repeat analysis) در مطالعات اپیدمیولوژی و فیلوژنی باکتری های بیماری زا کاربرد دارد. در مطالعه ای با غربالگری ژنوم کامل بورخولدریا مالنی و بورخولدریا سودومالنی تعداد ۳۲ لوکوس ژنتیکی در قالب یک سیستم ژنوتایپینگ MLVA برای این پاتوژن ها 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 کانون های قدیمی و پایدار اندمیک مسمشه محسوب می گردد؛ در بحرین (۱۴ و ۱۵)، پاکستان (۴) و امارات متحده عربی (۱۶) اپیدمیولوژی مسمشه با استفاده از روش های مولکولار بیولوژی مورد بررسی قرار گرفته است. ضمن آنکه ژنوم یک سویه هندی بورخولدریا مالنی به طور کامل تعیین توالی گردیده و اطلاعات آن پیش از این منتشر شده است (۱۷). این مطالعات نشان داده اند جمعیت این باکتری از تنوع ژنتیکی قابل توجه در منطقه برخوردار است. نقش سنتی تک سیمان به ویژه اسب در اقتصاد کشورهای 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 به کارگیری روش MLVA و با استفاده از ۶ لوکوس ژنتیکی ساختار ژنتیکی سویه *B. mallei* Razi325 مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج به دست آمده با ۳ سویه *Burkholderia mallei* ATCC 23344 (این سویه چینی در سال ۱۹۴۴ از یک بیمار مبتلا به مسمشه جدا شده است) (۱۸)؛ *Burkholderia mallei* SAVP1 و *Burkholderia mallei* BMQ که پیش از این ژنوم آنها به صورت کامل تعیین توالی ژنتیکی شده؛ مقایسه شده است. بورخولدریا مالنی دارای ۲ کروموزوم است که به نام کروموزوم های بزرگ (I) و کوچک (II) شناخته می شوند.

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

### روش بررسی

این مطالعه توصیفی در مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی کرج طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ انجام گردید.

### کشت باکتری

سویه *B. mallei* Razi 325 درون یک لوله کشت محتوی محیط ژلوز گلیسرینه کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت تا زمان مشاهده پرگنه های باکتری نگهداری شد.

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

| Locus/<br>primer            | Chromosome | Consensus repeat<br>sequence | Nucleotide sequence (5' 3')   | Amplicon size<br>(bp) |     |       |     | منبع                    |
|-----------------------------|------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----|-------|-----|-------------------------|
|                             |            |                              |                               | Razi 325<br>ATCC2334  | 4   | SAVPI | BMQ |                         |
| VNTR24f<br>VNTR24r          | Large (I)  | GCGCGAAGTGGC<br>ACGACATCCGCT | TTC TCG AAC TCG CCC TTC AC    | ۶۰۴                   | ۶۲۸ | ۶۲۸   | ۶۵۲ | مطالعه<br>حاضر          |
| CGG TGT TTT CGG TGC ATC TG  |            |                              |                               |                       |     |       |     |                         |
| VNTR41f<br>VNTR41r          | Large (I)  | GGCGC                        | ATG AGC TTC TGC CCA TCG AC    | ۵۰۹                   | ۵۰۹ | ۵۰۹   | ۵۰۹ | مطالعه<br>حاضر          |
| GTT GGG AAT AGA ACG GCG TG  |            |                              |                               |                       |     |       |     |                         |
| VNTR140f<br>VNTR140r        | Small (II) | GCGCCGAA                     | GTC GGG CAT TCC GTT TCA GA    | ۵۶۳                   | ۵۷۱ | ۵۷۱   | ۵۶۳ | U'Ren<br>و همکاران (۱۴) |
| AAC GGG AAG GGC GAG TCT     |            |                              |                               |                       |     |       |     |                         |
| VNTR1367f<br>VNTR1367r      | Small (II) | ACATCGAAC                    | GGC GCT GCC GTG GCC GGA CGA C | ۵۰۴                   | ۴۹۵ | ۴۶۸   | ۴۸۶ | U'Ren<br>و همکاران (۱۴) |
| GCC GGC GAA GCA TCG AGG CGG |            |                              |                               |                       |     |       |     |                         |
| VNTR2065f<br>VNTR2065r      | Small (II) | TCGATGAC                     | GGA AGT CCC CGA GTG AAC TG    | ۶۷۴                   | ۶۷۴ | ۶۵۸   | ۶۶۶ | U'Ren<br>و همکاران (۱۴) |
| GTT ACG ACT TCT CCG GGC AT  |            |                              |                               |                       |     |       |     |                         |
| VNTR2971f<br>VNTR2971r      | Small (II) | AAGCACG                      | AAC GAC GGT GTG GTC TTT CA    | ۷۴۱                   | ۷۴۸ | ۷۴۱   | ۷۴۴ | U'Ren<br>و همکاران (۱۴) |
| CAA CAC GCT CGT CTA CCT GA  |            |                              |                               |                       |     |       |     |                         |

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

| PCR protocol | PCR master<br>mix (μl) | Primer forward1<br>(μl) | Primer<br>reverse1 (μl) | MgCl22 (μl) | DNA<br>template (μl) | PCR water<br>(μl) | Total volume<br>(μl) |
|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| ۱            | ۶                      | ۱                       | ۱                       | ۰           | ۲/۵                  | ۱/۵               | ۱۲                   |
| ۲            | ۶                      | ۱                       | ۱                       | ۰/۳۶        | ۲/۵                  | ۱/۱۴              | ۱۲                   |
| ۳            | ۶                      | ۰/۲                     | ۰/۲                     | ۰           | ۲/۵                  | ۳/۱۵              | ۱۲                   |
| ۴            | ۶                      | ۰/۲                     | ۰/۲                     | ۰/۳۶        | ۲/۵                  | ۲/۷۴              | ۱۲                   |
| Universal    | ۶                      | ۰/۲                     | ۰/۲                     | ۰           | ۱/۵                  | ۴/۱               | ۱۲                   |

تقریباً در قسمت میانی قطعه قرار داشته باشد. برای طراحی پرایمر از برنامه 3 Primer استفاده شد (۲۰ و ۲۱). 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 منیزیم (۱mM یا 2.5 mM) به‌عنوان متغیر اعمال گردید. مواد و اجزاء متعارف مورد نیاز در واکنش‌های PCR (به‌جز پرایمرها و

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 به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. واکنش PCR شامل یک مرحله Initial denaturation با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن ۳۰ نوبت چرخه‌های متوالی Denaturation با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 ۲ 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.

**بهبه‌سازی 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 (منزیوم کلراید و پرایمر) در مورد همه لوکوس‌ها انتخاب شد (جدول ۲). این پروتکل در اجرای PCR همه ۶ لوکوس انتخاب شده به کار گرفته شد.

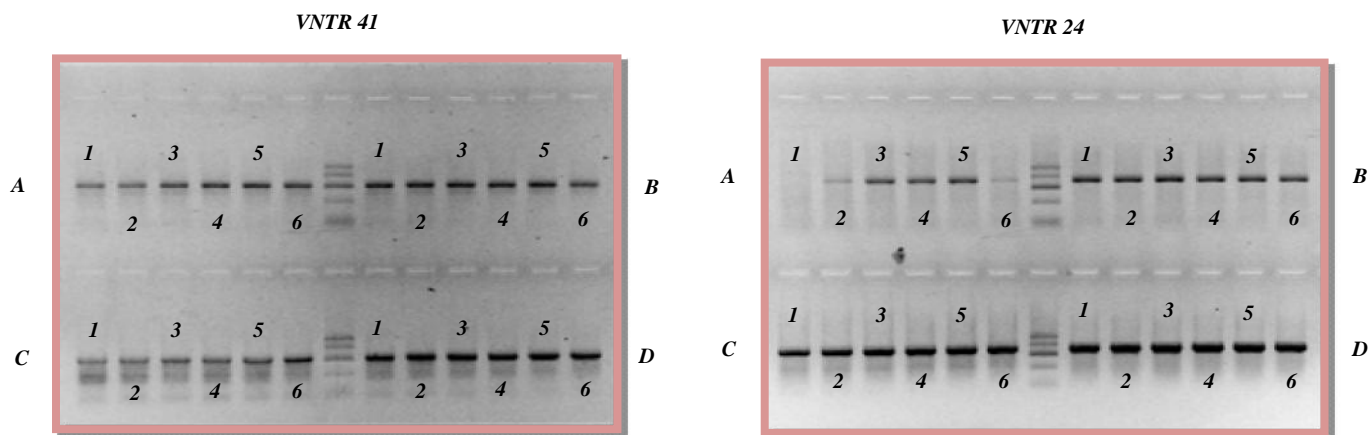
**تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR**

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

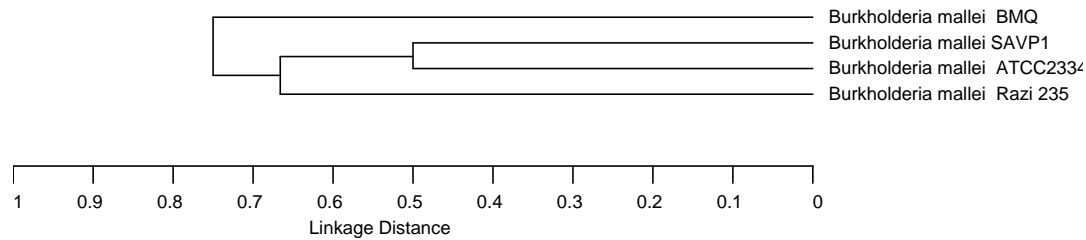
**یافته‌ها**

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



شکل ۱: بهینه‌سازی فرایند PCR در مورد آزمایش‌های MLVA genotyping مربوط به لوکوس‌های *BM 24* و *BM 41*. نتایج ژل الکتروفورز محصولات آمپلی‌فیکاسیون مربوط به پروتکل‌های A، B، C و D است. اعداد ۱ تا ۶ گرادیان دمایی مرحله annealing را به ترتیب برابر با ۵۶/۱، ۵۶/۷، ۶۰/۱، ۶۲/۷، ۶۳/۹ و ۶۵/۹ 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 MgCl<sub>2</sub>، 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 ۶ لوکوس VNTR نمایشی از ارتباط ژنتیکی میان سویه غیرایرانی *Burkholderia mallei* Razi 325 مورد استفاده در تولید مالین در ایران با ۳ سویه شناخته شده بین المللی *Burkholderia mallei* ATCC23344، *Burkholderia mallei* SAVP1 و *Burkholderia mallei* BMQ

## بحث

مشابهی بر روی تعدادی جدایه‌های کلینیکی بورخولدریا مالئی که در سال‌های اخیر در ایران از میزبان‌های مختلف در جریان اپیدمی‌های مسمشه 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 در جاتی 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 قابل توجهی 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

انجام این مطالعه امکان آمپلیفیکاسیون همزمان هر شش لوکوس VNTR2065، VNTR1367، VNTR140، VNTR41، VNTR24 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 نویسنده‌گان 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 گلیسرینه به این مؤسسه وارد و از آن پس به نام *Burkholderia mallei* Razi 325 شناخته شد. تهیه و تولید صنعتی مالین 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

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 توپرکولین و مالین 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 (1820-1897)]. *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:

می‌توان ضمن دستیابی به درک صحیح‌تر از اپیدمیولوژی مضمشه 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 میکروبی‌شناسی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد بود. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی (شماره ۹۰۶۰-۱۸-۱۸-۲)

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)<sup>1,2</sup>, Tadayon K (Ph.D)\*<sup>3</sup>, Mosavari N (Ph.D)<sup>3</sup>, Tajbakhsh E (Ph.D)<sup>4</sup>  
Keshavarz R (DVM)<sup>5</sup>, Ghaderi R (Ph.D)<sup>5</sup>, Sekhavati M (M.Sc)<sup>6</sup>, Banihashemi R (M.Sc)<sup>6</sup>  
Najafpour R (M.Sc)<sup>1,2</sup>, Mohrekesh Haghighat M (M.Sc)<sup>2</sup>, Dehghanpour M (B.Sc)<sup>7</sup>

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