مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره سوم (پیاپی ۲۴) پاییز ۱۳۹۴
صفحات ۱۹۹-۱۹۰

Original Article

بهینه سازی روش آنالیز واحدهای پشت سر هم تکرار شونده (VNTR) در ماشین های ترموسایکلر کلاسیک به منظور تایپینگ مولکولی *بورخولدریا مالئی*

رضا نجف پور[۱]، نادر مصوری*[۲]، کیوان تدین[۲]، الهه تاج بخش[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، شهرکرد، [۲] استادیار، موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی، کرج، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: *بورخولدریا مالئی* عامل مشمشه و یکی از قدیمی ترین بیماری های عفونی واگیردار و مشترک بین انسان و حیوان است که اغلب تک سمی ها (اسب، الاغ، قاطر و گورخر) را مبتلا می نماید. همگام با پیشرفت در مطالعه ژنوم باکتری های بیماری زا در سال های اخیر، روش های مولکولی به منظور مطالعه مقایسه ای و اپیدمیولوژی *بورخولدریا مالئی* توسعه یافته اند. این مطالعه برای اولین بار با هدف بهینه سازی روش آنالیز متکی بر واحدهای پشت سر هم تکرار شونده (VNTR) بر پایه چهار لوکوس BM140، BM1367، BM2065 و BM2971 به منظور تایپینگ مولکولی *بورخولدریا مالئی* انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، سویه *بورخولدریا مالئی* Razi 325 به عنوان سویه استاندارد از آرشیو میکروارگانیسم های موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. پس از استخراج ژنوم و انجام PCR برای هر ٤ لوکوس، نتایج مربوطه برای هر لوکوس به صورت مستقل و تجمیعی مورد بازبینی قرار گرفت. یک دستورالعمل واحد قابل اجرا از نظر دما و غلظت اجزای مهم متغیر سازنده (کلرایدمنیزیم و پرایمرها) برای همه لوکوس ها تنظیم شد.

یافته ها: مقایسه توالی جدایه با سویه های مرجع، پلی مورفیسم را در هر ٤ لوکوس مورد مطالعه نشان داد.

نتیجه گیری: شاخص ترین یافته کاربردی این تحقیق، توسعه یک دستورالعمل واحد PCR بود که هم از نظر اجزا و هم از نظر دما امکان اجرای چهار واکنش متفاوت را به صورت هم زمان در یک دور فعالیت ماشین PCR فراهم نمود.

واژگان کلیدی: *بورخولدریا مالئی*، لوکوس *Bm140*، لوکوس *Bm1367*، لوکوس *Bm2065*، لوکوس *Bm2971*.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹٤

مقدمه

مشمشه یکی از بیماری های عفونی واگیردار و مشترک بین انسان و حیوان می باشد که اغلب تک سمی ها (اسب، الاغ، قاطر و گورخر) را مبتلا می سازد. عامل ایجاد بیماری، باکتری گرم منفی *بورخولدریا مالئی* (*Burkholderia mallei*) می باشد. انسان به مشمشه حساس است و عدم درمان در بیشتر موارد منجر به مرگ افراد می گردد (۱و۲). این بیماری به عنوان یک بیماری شغلی مطرح است (۳). به واسطه امکان انتشار این ارگانیسم از طریق ریزگردها و نبود واکسن و درمان موثر و قطعی برای آن، در زمینه جنگ های بیولوژیک و تهدیدهای بیوتروریستی مورد توجه می باشد (٤ و٥).

پیشرفت های اخیر در مطالعه ژنوم عوامل بیماری زای باکتریایی و توسعه روش های مولکولی، مطالعه مقایسه ای و اپیدمیولوژی *بورخولدریا مالئی* را هموار ساخته است (٦ و٧). اپیدمیولوژی مولکولی به دنبال تکمیل و ارتقاء کیفی سطح دانش اپیدمیولوژی کلاسیک با به کارگیری روش ها و ابزارهای مدرن مولکولی می باشد. اگر چه از نظر تئوری قابل

*) آدرس برای مکاتبه: کرج، موسسه تحقیقات وسرم سازی رازی، بخش توبرکولین، مالئین و یونین کرج. تلفن: ۰۲٦۳٤٥۰۲۸۹٥ پست الکترونیک: n.mosavari@rvsri.ac.ir

اعتمادترین راهکار در تشخیص و مقایسه سویه ها بررسی ژنوم کامل آن ها است. اما سطح پیشرفت روش های آزمایشگاهی تعیین توالی نوکلئوتیدها و سرعت عمل تجهیزات در حال حاضر به گونه ای نیست که این امکان را به صورت فراگیر فراهم نماید. به همین دلیل این روش یک راه حل عملی نیست و در حال حاضر روش های انگشت نگاری ژنتیکی که در واقع به بررسی بخش یا بخش های محدود از ژنوم سویه های بیماری زای میکروارگانیسم ها می پردازد از استقبال عمومی برخوردار است (۸).

اکتشاف و بهینه سازی این روش های تایپینگ مولکولی موجب افزایش ظرفیت و توانایی در شناسایی هر چه بهتر شیوع این بیماری، انجام نظارت و درک و توضیح اپیدمیولوژی سویه ها و سروتیپ ها گردیده است. به طوری که به وسیله ی آن ها می توان ارتباط ژنتیکی میان سویه های بیماری زای مربوط به یک گونه واحد را اندازه گیری نمود (۹).

استفاده از واحدهای تکرار شونده ژنومی(Tandem repeat) به دلیل مشاهده تنوع در تعداد آن ها در مناطق ویژه ای از ژنوم باکتری که لوکوس VNTR نام دارند، به عنوان عامل تنوع ژنتیکی، در مطالعه تنوع ژنتیکی میان سویه های باکتری عمومیت یافته اند (۱۰و۱۱).

به تازگی پژوهش های اپیدمیولوژیکی نشان داده است که گسترش جغرافیایی *بورخولدریا مالئی* در حال حاضر در سراسر جهان با فعالیت های دامپروری و تجارت دام در گذشته و حال در ارتباط می باشد و از الگوهای انتشار مشخصی پیروی می کند. ایران به عنوان خاستگاه یکی از کهن ترین تمدن های شناخته شده بشری یکی از هسته های اصلی و اولیه پرورش اسب از سوی انسان محسوب می گردد. علاوه بر این قرار گرفتن ایران بر سر شاهراه کهن جاده ابریشم که مسیر تجارت بین المللی دام و فرآورده های دامی برای قرن های متمادی بوده است، نشان گر اهمیت آگاهی از ساختار ژنتیکی جمعیت *بورخولدریا مالئی* در این کشور می باشد (۱۲). روش VNTR با توجه به آسانی، تکرار پذیری و قدرت تشخیصی بالا در مطالعات ژنوم نسبت به سایر روش های ژنوتایپینگ برتری دارد. مطالعه حاضر به منظور بهینه سازی روش VNTR بر پایه چهار لوکوس BM140، BM1367، BM2065 و BM2971 به منظورتایپینگ مولکولی *بورخولدریامالئی* برای اولین بار صورت گرفت. در این مطالعه چگونگی اعمال تغییرات تکنیکی شرح داده می شود که با استفاده از آن ها می توان تمام چهار لوکوس معرفی شده را با استفاده از روش PCR کلاسیک و به کارگیری یک دستورالعمل واحد به گونه ای تکثیر نمود که فرآورده های به دست آمده آماده انجام آزمون تعیین توالی باشند.

هدف از این مطالعه توسعه یک دستورالعمل واحد PCR بود که بتواند از نظر اجزا و دما امکان اجرای چهار واکنش متفاوت را به صورت هم زمان در یک دور فعالیت ماشین PCR جهت تایپینگ مولکولی *بورخولدریا مالئی* ایجاد نماید.

مواد و روش ها

الف) جدایه ها و سویه باکتری: سویه *بورخولدریا مالئی* 325 رازی (*Burkholderia mallei* Razi325) به عنوان سویه استاندارد به شماره شناسایی (RTCC 2375) از آرشیو میکروارگانیسم های موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در مطالعه حاضر تهیه شد.

ب) کشت باکتری: سویه مورد مطالعه از محیط کشت مایع نوترینت گلیسرینه و محیط کشت جامد آگار گلیسرینه (Merck, Germany) در محیط آگار خون دار تجدید کشت و به مدت ٤٨-٢٤ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شد.

ج) استخراج ژنوم باکتری: ژنوم باکتری به روش جوشانیدن استخراج گردید. به همین منظور معادل یک لوپ کامل از کشت ٢٤ ساعته باکتری برداشته شد و به ٤٠٠ میکرولیتر بافر TB-lysis در یک میکروتیوب دارای واشر ضد نشت (O-ring) انتقال داده شد. به کمک یک وزنه فلزی مناسب میکروتیوب در کف محفظه یک بن ماری محتوی آب در حال جوش (۹۵ °C) قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در همین وضعیت نگه داشته شد تا باکتری های انتقال داده شده در فرم رویشی به طور کامل

غیرفعال گردند. در مرحله بعد میکروتیوب در g ۸۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع شناور سطحی محتوی ژنوم باکتری از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد. این اقدام احتیاطی به منظور از بین بردن احتمال باقی ماندن باکتری فعال در سوسپانسیون محتوی ماده ژنتیکی باکتری صورت گرفت. میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به دست آمده بر روی یک پلیت محیط مغذی آگار خون دار کشت داده شد. ظرف کشت به گرمخانه ۳۷ °C انتقال داده شد و به مدت ۲٤ ساعت نگه داری و از نظر وجود هر گونه نشانه ای از رشد احتمالی باکتری مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون های محتوی ژنوم استخراج شده باکتری پس از اطمینان از غیرفعال شدن کامل همه سلول های باکتری تا زمان مصرف در یخچال یا فریزر نگه داری شدند (۱۳).

د) طراحی پرایمر: ژنوم کامل سویه *Burkholderia mallei* (ATCC 23344) با استفاده از برنامه *Artemis* (۱٤) مورد جستجو قرار گرفت. موقعیت مکانی تمام چهار لوکوس بر اساس پرایمرهای طراحی شده مکان یابی شد. حدود ۲ kb از ژنوم باکتری در محدوده هر لوکوس به گونه ای انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر تقریباً در میانه قرار داشته باشد. طراحی پرایمر برای هر لوکوس به صورت مستقل با استفاده از برنامه *Primer 3* (۱۵ و ۱٦) صورت گرفت و در تنظیمات برنامه، اندازه محصول PCR در محدوده ۷۵۰–٤۵۰ زوج باز تعریف شد (جدول ۱).

ه) آزمون های مولکولی: در این مطالعه، برای هر لوکوس چهار دستورالعمل PCR به گونه ای تنظیم شد که هر دستورالعمل از ٦ واکنش تکثیر مترادف با ٦ دمای مختلف اتصال (۵٦/۱، ۵٦/۷، ٦۰/۱، ٦۲/۷، ٦۳/۹ و ٦۵/۹ درجه سلیسیوس تشکیل شده باشد. با هدف دستیابی به شش دمای مختلف در محدوده متغیر ±۱۰ درجه سلیسیوس، دو دمای کمینه ۵٦ و بیشینه ٦٦ درجه سلیسیوس برای ماشین ترموسایکلر تعیین گردید. شش دمای اشاره شده در عمل بر اساس توانایی های فنی ترموبلاک دستگاه مشخص گردیدند. بدین ترتیب در مجموع ۲٤ واکنش PCR مستقل در مورد هر آزمایش مولکولی صورت پذیرفت.

از طرف دیگر در مورد نیمی از واکنش ها میزان پرایمر مصرفی (معادل ۱ پیکومول) و در نیمی دیگر برابر با ۵ پیکومول از هر پرایمر استفاده گردید. در عین حال در نیمی از واکنش ها تنها به کلرید منیزیم موجود در مخلوط آماده مصرف تجارتی آمپلیکور (۱ mM) اکتفا گردید در حالی که در نیم دیگر آن ها با اضافه کردن مقدار اضافی غلظت نهایی این ماده در هر واکنش در حد ۲/۵ mM تنظیم گردید. اعمال این روش باعث شد انجام تمام آزمایش های مولکولی مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از بهترین دستورالعمل اجرایی ممکن از نظر دمای اتصال، غلظت کلرید منیزیم و هم چنین میزان پرایمر صورت گیرد.

و) الکتروفورز و تصویربرداری از محصولات PCR: برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل ۱/۵ درصد آگاروز با درجه بیولوژی مولکولی (Invitrogen®, USA) از پیش رنگ شده با Red Safe® استفاده شد. پس از بارگذاری، ژل ها به مدت ۲ ساعت در میدان الکتریکی به قدرت ۲ V/cm رانده و سپس

جدول ۱: لوکوس ها و پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق. طول فرآورده های به دست آمده از تکثیر هر لوکوس (در مقیاس زوج باز) و موقعیت مکانی آن ها بر اساس ژنوم *Burkholderia mallei* (ATCC 23344) مشخص گردیده است.

لوکوس ها	پرایمرها('۵ به '۳)	سایز محصول تکثیر(bp) (موقعیت در ژنوم)
BM 140	F) GTC GGG CAT TCC GTT TCA GA	570
BM 1367	F) GGC GCT GCC GTG GCC GGA CGA C	494
BM 2065	F) GGA AGT CCC CGA GTG AAC TG	673
BM 2971	F) AAC GAC GGT GTC GTC TTT CA R) CAA CAC GCT CGT CTA CCT GA	747 (534065..533318)

در دستگاه ژل داک (BioRad®, USA) مورد تصویربرداری قرار گرفتند. با مقایسه باندهای مشاهده شده هر لوکوس با باندهای سایز مارکر DNA استاندارد ۲۰۰ bp (Invitrogen®, USA) اندازه تقریبی محصولات PCR مشخص گردید.

ز) بهینه سازی دما و اجزای آزمون های PCR: نتایج تصویری مربوط به آزمون های چهارگانه هر لوکوس به صورت مستقل و یافته های تمام چهار لوکوس به صورت تجمیعی مورد بازبینی قرار گرفت و یک دستورالعمل واحد قابل اجرا از نظر دما و غلظت اجزای مهم متغیر سازنده (کلراید منیزیم و پرایمرها) برای همه لوکوس ها تنظیم شد (جدول ۲). از این دستورالعمل واحد برای تکثیر هر چهار لوکوس ژنوم سویه *B. mallei* Razi325 موجود در آرشیو میکروبی موسسه رازی استفاده شد.

ح) شرایط PCR: به منظور انجام واکنش های PCR، از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf, Germany) استفاده گردید. تمام دستورالعمل های PCR مشتمل بر یک دور حرارتی مقدماتی برای جداسازی دو رشته DNA (واسرشت ابتدایی) و به دنبال آن تعداد متفاوتی از چرخه های تکراری شامل مراحل واسرشت شدن با دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه ، ٦ دمای مختلف اتصال (٥٦/١، ٥٦/٧، ٦٠/١، ٦٢/٧، ٦٣/٩ و ٦٥/٩ درجه سلیسیوس) به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش اولیه با دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه بود که با یک مرحله نهایی تکمیلی (گسترش نهایی) به مدت ٦۰۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس خاتمه یافت. در مجموع این آزمون با ۳۰ سیکل انجام شد.

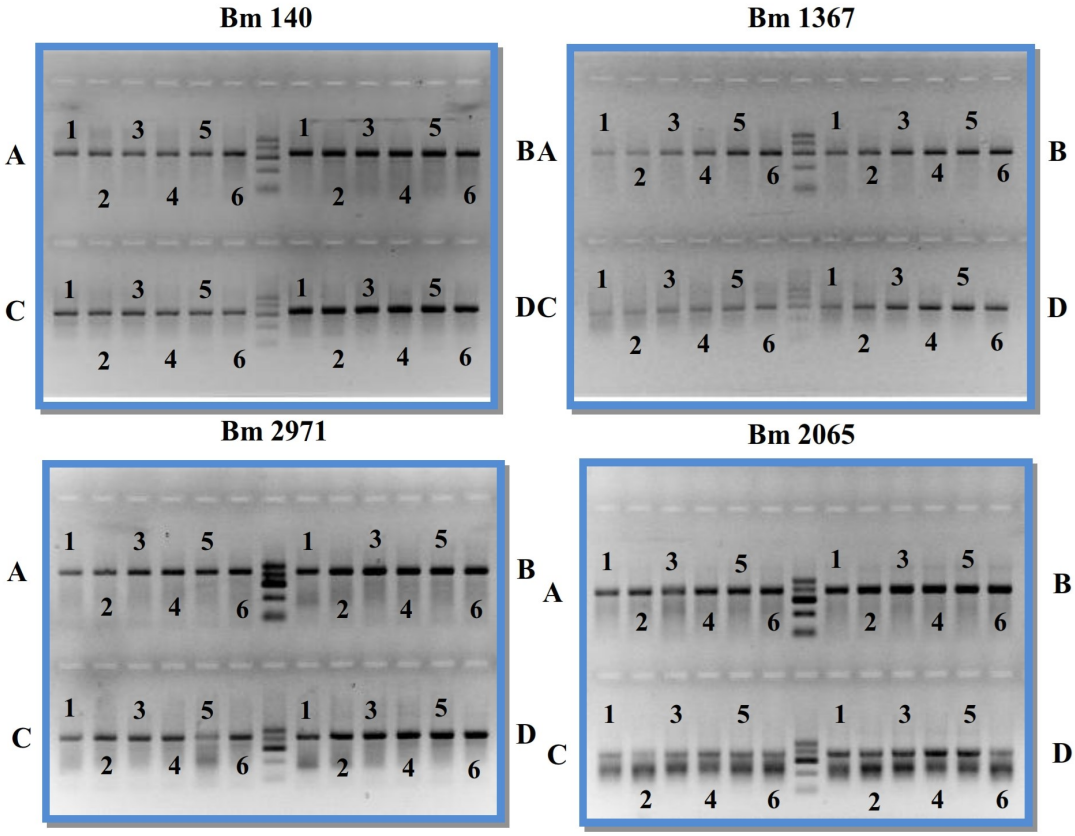
ط) تعیین توالی نوکلئوتیدها و تعیین اندازه محصولات PCR: به منظور اطمینان از درستی عملکرد دستورالعمل به دست آمده توالی نوکلئوتیدهای محصولات تکثیر یافته مربوط به هر چهار لوکوس جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. نتایج با استفاده از نرم افزارهای Clustal (۱۷) و Chromas پردازش و هم خوانی آن ها با مناطق هم ارز از ژنوم معرفی شده *Burkholderia mallei* (ATCC 23344) مقایسه گردید.

یافته ها

آزمون های PCR چهارگانه (در مجموع ٢٤ واکنش برای هر لوکوس) در مورد هر چهار لوکوس به صورت مستقل با موفقیت اجرا گردید. دستیابی به یک دستورالعمل واحد مشترک از نظر دما و اجزای سازنده با توجه به یافته های مستقل چهار لوکوس امکان پذیر گردید و در عمل همه لوکوس ها با موفقیت در جریان یک فرآیند PCR تکثیر شدند. محصولات چهار گانه با موفقیت در آزمایشگاه همکار تعیین توالی نوکلئوتیدی شدند و بررسی مقایسه ای آن ها با ژنوم سویه استاندارد *Burkholderia mallei* (ATCC 23344) نشان دهنده مطابقت کامل محصولات با قطعات هم ارز در ژنوم این سویه بود. تکثیر لوکوس های چهار گانه در تمام جدایه ها با استفاده از دستورالعمل به دست آمده PCR با موفقیت صورت پذیرفت (شکل ۱). هم چنین با استفاده از نرم افزار *Clustal* هم خوانی توالی های تعیین شده هر چهار جایگاه با مناطق هم ارز ژنوم معرفی شده *Burkholderia mallei* (ATCC 23344) نشان داده شد (شکل ۲).

جدول ۲: اجزای سازنده مورد استفاده در دستورالعمل های PCR مورد استفاده در این تحقیق.

روش PCR	واکنش PCR (µl)	پرایمر پیش رونده (µl)	پرایمر پس رونده (µl)	کلرید منیزیم (µl)	DNA الگو(µl)	آب مقطر (µl)	حجم نهایی (µl)
۱	٦	۰/۲	۰/۲	۰/۳٦	۲/٥	۲/۷٤	۱۲
۲	٦	۰/۲	۰/۲	۰	۲/٥	۲/۳۸	۱۲
۳	٦	۱	۱	۰/۳٦	۲/٥	۱/۱٤	۱۲
۴	٦	۱	۱	۰	۲/٥	۰/۷۸	۱۲



شکل ۱: بهینه سازی فرآیند PCR در مورد آزمایش های MLVA genotyping مربوط به لوکوس های BM140، BM1367، BM2065 و BM2971. نتایج ژل الکتروفورز محصولات آمپلی فیکاسیون مربوط به دستورالعمل های A, B, C, D اعداد ۱ تا ٦ گرادیان دمایی مرحله اتصال پرایمر را به ترتیب برابر با ٥٦/١، ٥٦/٧، ٦٠/١، ٦٢/٧، ٦٣/٩ و ٦٥/٩ درجه سلیسیوس نشان می دهند. در هر واکنش PCR در سری A و B یک پیکومول از هر پرایمر وجود دارد و میزان همین پرایمرها در مورد سری های C و D برابر با پنج پیکومول می باشد. در ارتباط با میزان MgCl2، غلظت این ترکیب در سری های B و D برابر با یک میلی مولار و غلظت همین ترکیب در واکنش های سری A و C برابر ۲/٥ میلی مولار می باشد، سایز مارکر DNA مورد استفاده دارای ٥ باند در محدوده ۱۰۰ الی ۹۰۰ bp می باشد.

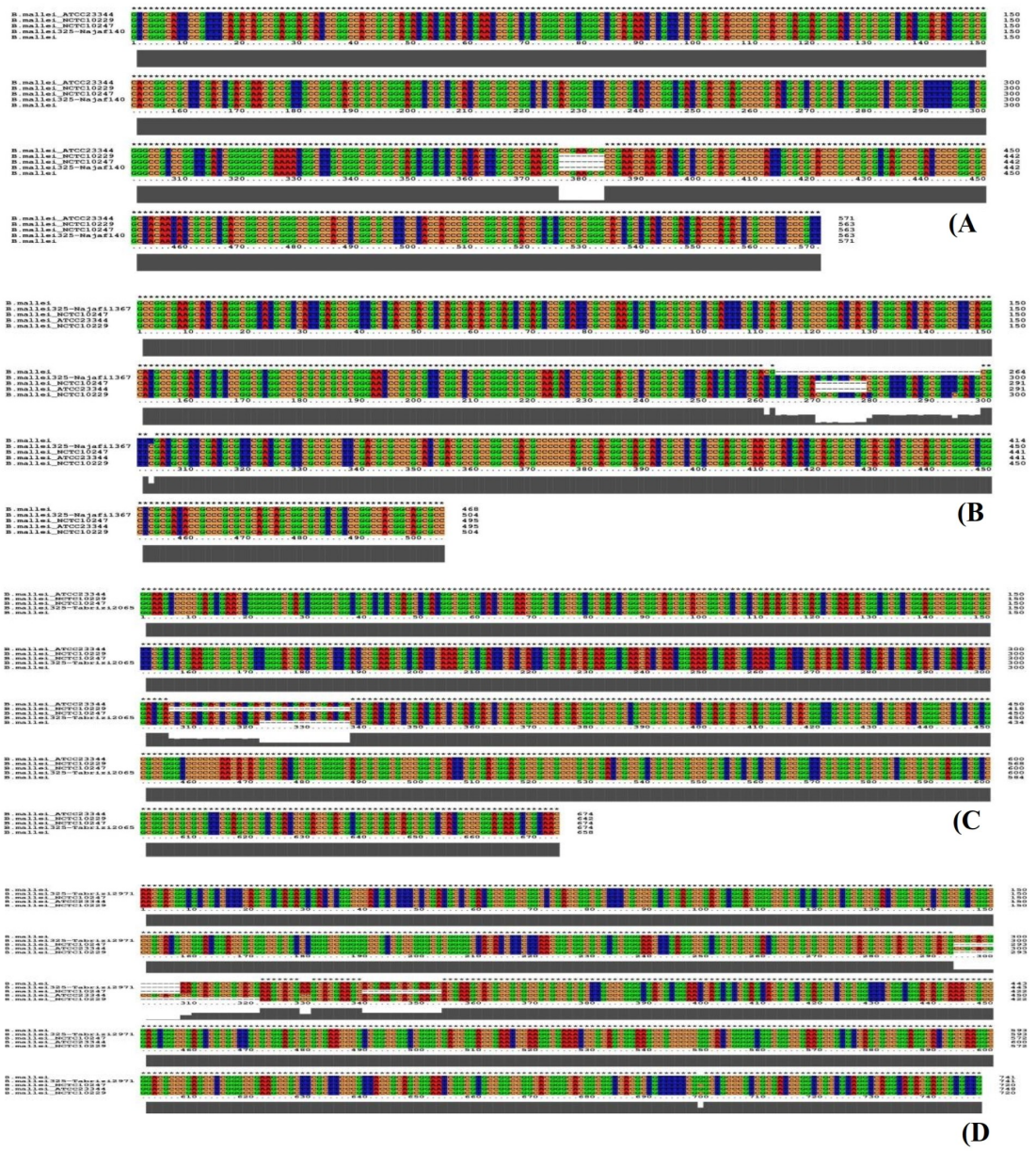
بحث

بورخولدریا مالئی و *سودومالئی* دارای ویژگی هایی می باشند که آن ها را در زمره بهترین عوامل مناسب برای تولید تسلیحات بیولوژیک قرار می دهد (۱۸ و ۱۹). بدین ترتیب توانایی در تشخیص سریع، درست و همچنین افتراق بین سویه های *بورخولدریا مالئی* و *سودومالئی* که عوامل بیماری زای انتخابی مناسب برای این گونه تسلیحات هستند، از اهمیت زیادی برخوردار می باشد (۲۰).

با وجود معرفی بیش از ٤۳ گونه مستقل در جنس *بورخولدریا*، *بورخولدریا مالئی* و *بورخولدریا سودومالئی* (عامل Melioidosis) به عنوان دو گونه بسیار نزدیک از نظر ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی و همچنین تظاهرات بیماری ایجاد شده در انسان و دام بیمار شناخته می شوند (۲۳-۲۱). ضمن آنکه یافته های جدید ژنتیکی نشان داده اند که *بورخولدریا مالئی* احتمالا در جریان بروز فرآیندهای تکاملی ژنومی پس از ورود یک سویه *بورخولدریا سودومالئی* به یک میزبان حیوانی موجودیت یافته است (۲٤). آمپلیفیکاسیون بسیاری از لوکوس های VNTR شناخته شده در ژنوم جدایه های *بورخولدریا سودومالئی* به راحتی و بدون نیاز به انجام تنظیمات فنی در مورد جدایه های *بورخولدریا مالئی* نیز قابل انجام می باشند. در حالی که این لوکوس ها یا اصالتاً در ژنوم سایر بورخولدریاهای بیماری زا، مانند *بورخولدریا*

تایلندنسیس (*Burkholderia thailandensis*) و *بورخولدریا سپاسیا* (*Burkholderia cepacia*) وجود ندارند و یا آن که آمپلیفیکاسیون آن ها در جدایه های این گونه ها با دشواری همراه می باشد (۲۵). لوکوس های VNTR140، VNTR1367، VNTR2065 و VNTR2971 مورد استفاده در تحقیق حاضر در همین گروه قرار دارند. بر همین اساس استفاده از سیستم ژنوتایپینگ MLVA ضمن آن که از نظر اپیدمیولوژیکی ارزشمند می باشد، توانایی تشخیص تفریقی میان دو گونه نزدیک *بورخولدریا مالئی* و *بورخولدریا سودومالئی* با دیگر گونه های جنس بورخولدریا را نیز فراهم می نماید (۲۵).

در میان چهار لوکوس ژنتیکی مورد استفاده در این مطالعه تمامی لوکوس های VNTR140، VNTR1367، VNTR2065 و



شکل۲: چیدمان مقایسه ای توالی نوکلئوتیدها در لوکوس های (A) Bm 140، (B) Bm1367، (C) Bm2065 و(D) Bm2971 از ژنوم سویه های استاندارد ATCC2344، NCTC10229، NCTC10247، SAVP1 و Razi325 *B. mallei* ترسیم این تصویر به وسیله برنامه *Clustal 2.0.11* انجام گرفته است. اعداد پایانی سمت راست نشان دهنده طول قطعه هم ارز از لوکوس در هر ژنوم و ستاره ها نشانگر وجود نوکلئوتیدهای هم پوشان می باشند. خطوط نقطه چین (در صورت وجود) نبود نوکلئوتیدهای هم پوشان در میان ژنوم های مورد تحقیق را نشان می دهد.

VNTR2971 بر روی کروموزوم کوچک (کروموزوم شماره ۲) باکتری قرار گرفته اند. کروموزوم بزرگ *بورخولدریا مالئی* اساساً ژن هایی را شامل می گردد که برای رشد باکتری مورد نیاز می باشند. در حالی که کروموزوم کوچک محتوی ژن های متنوعی است که در بقای ارگانیسم و تطابق آن با شرایط محیطی دخالت دارند (۲۵).

بالا بودن سطح تنوع ژنتیکی در لوکوس های مورد مطالعه پیش از این مورد توجه محققین دیگر نیز قرار گرفته است (۲۵). نگارنده موضوع استفاده از این لوکوس در هر نوع مطالعه مشابه دیگر بر روی جدایه های *بورخولدریا مالئی* در ایران را مورد تذکر قرار می دهد.

در روش ژنوتایپینگ پیشنهادی U'Ren از اولیگونوکلئوتیدهای علامت گذاری شده با رنگ های فلورسنت استفاده شد (۲۵) اما در مطالعه حاضر با توجه به موضوع محدودیت در تجهیزات و همچنین هزینه، روش کار به گونه ای تنظیم گردید که امکان تکثیر قطعات ژنومی با استفاده از یک ماشین ترموسایکلر معمولی قابل اجرا باشد. این روش پیش از این در مؤسسه رازی با موفقیت در مورد روش تایپینگ SNPs *باسیلوس آنتراسیس* به کار گرفته شد (۲٦).

یکی از شاخص ترین یافته های کاربردی این تحقیق توسعه و معرفی یک دستورالعمل واحد PCR می باشد که هم از نظر اجزا و هم از نظر دما امکان اجرای چهار واکنش متفاوت را به صورت هم زمان در یک دور فعالیت ماشین PCR فراهم می نماید. این درحالی است که در روش محققین دیگر از بیش از یک دستورالعمل برای تکثیر قطعات ژنتیکی مورد نظر استفاده شده است.

از دیگر یافته های کاربردی مطالعه حاضر شناسایی ویژگی های ژنتیکی سویه *Burkholderia mallei* Razi 325 می باشد. بر اساس اطلاعات موجود در مؤسسه رازی، در سال ۱۹۵٦ 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 حداقل از دو دیدگاه دارای اهمیت می باشد. اولاً از نظر مقررات بین المللی ناظر بر تولید فرآورده های بیولوژیک که شناسایی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه (بذر) مورد استفاده در تولید فرآورده را ضروری می داند. ثانیاً از نظر کسب توانایی تشخیص افتراقی در شرایطی مانند احتمال بروز آلودگی های اتفاقی آزمایشگاهی (آلودگی متقاطع) در جریان کار با سویه های مختلف این باکتری که در آزمایشگاه موجود می باشند. با انجام مطالعه حاضر و ارتقای اطلاعات موجود اکنون دو نگرانی مورد اشاره تا حد زیادی مورد توجه قرار گرفته اند.

در جریان استخراج ماده ژنتیکی *بورخولدریا مالئی* در مطالعه حاضر پس از غیرفعال نمودن باکتری توسط حرارت، سوسپانسیون به دست آمده از فیلتر ۰/۲ میکرولیتر گذرانیده شد تا هرگونه احتمال بقای باکتری از بین برده شود (۱۳).

طراحی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به گونه ای صورت پذیرفت که اندازه تمام قطعات مورد انتظار در محدوده ۷۵۰–٤۵۰ زوج باز باشد. بدین ترتیب شناسایی آن ها در جریان ژل الکتروفورز را آسان تر می نماید.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، با توسعه مطالعه حاضر و تعمیم آن به تمام جدایه های بالینی ایران در سال های آینده و در کنار آن افزایش تعداد لوکوس های ژنتیکی مورد بررسی می توان ضمن دست یابی به درک صحیح تر از اپیدمیولوژی مشمشه در ایران کیفیت اجرا و مبانی برنامه مبارزه با این بیماری را در ایران ارتقاء بخشید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی کارکنان موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و هم چنین از کارکنان بخش توبرکولین، مالئین، یونین و بخش واکسن های هوازی این

موسسه به ویژه سرکار خانم مریم مهره کش حقیقت و آقای مهدی دهقان پور به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند. هزینه های مربوط به انجام این تحقیق به طور کامل توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و در قالب یک فقره پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۰۰۶۰-۱۸-۱۸-۲ تامین گردیده است.

References

1. Taghipour A, Khaje Nassir Sh, Ghaazi, Marashi SM, Masoodi Zanjani S, Molookpour H .First clinical report of the Glanders in Siberian tiger Panthera tigris altaica. J Vet Clin Res. 2011; 2(1): 130-134.

2. Akbarein H, Bahonar AR, Dabbagh Moghaddam A, Bolouki Z, Shokouh H. Glanders, a new vision on an old biological weapon. HBI J. 2012; 10(2): 143-162.

3. Scholz HC, Joseph M, Tomaso H, Al Dahouk S, Witte A, Kinne J. 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. Diag Microbiol Infect Dis. 2006; 54(4): 241-247.

4. Sodoy D, Randle G, Simpson AJ, Aanensen DM, Pitt TL, Kinoshita R. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J Clin Microbiol. 2003; 41(5): 2068-2079.

5. Ulrich MP, Norwood DA, Christensen DR, Ulrich RL. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. J Med Microbiol. 2006; 55(5): 551-559.

6. Zhang B, Wear DJ, Kim HS, Weina P, Stojadinovic A, Izadjoo M. Development of hydrolysis probe-based real-time PCR for identification of virulent gene targets of *Burkholderia pseudomallei* and *B.mallei*- a retrospective study on archival cases of service members with melioidosis and glanders. Mil Med. 2012; 177(2): 216-221.

7. Janse I, Hamidjaja RA, Hendriks AC, Van Rotterdam BJ. Multiplex PCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. BMC Infect Dis. 2013; 13: 86.

8. Coenye T, LiPuma JJ. Molecular epidemiology of *Burkholderia species*. Frontiers Bioscience. 2003; 1(8): 68-88.

9. Hendriksen R. 2010. Global epidemiology of non-typhoidal *Salmonella* infections in humans, PhD Thesis, DTU Food, National Food Institute.

10. Antonov VA, Tkachenko GA, Altukhova VV, Savchenko SS, Zinchenko OV, Viktorov DV, Zamaraev VS, Ilyukhin V, Alekseev VV. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 1 (Suppl 102):134-139.

11. Wernery U, Wernery R, Joseph M, Al-Salloom F, Johnson B, Kinne J, Jose S, Jose S, Tappendorf, B, Hornstra H, Scholz HC. Natural *Burkholderia mallei* infection in Dromedary, Bahrain. Emerg Infect Dis. 2011; 17(7): 1277-1279.

12. McNeill JR. europe's place in the global history of biological exchange. Landscape Res. 2008; 28(1): 33-39.

13. Aikembayev AM, Lukhnova L, Temiraliyeva G, Meka-Mechenko T, Pazylov Y, Zakaryan S,

Denissov G, Easterday WR, Van Ert MN, Keim P, Francesconi SC, Blackburn JK, Hugh-Jones M, Hadfield T. Historical distribution and molecular diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. Emerg Infect Dis. 2010; 16(5): 789-796.

14. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. Bioinformatics. 2012; 28(4): 464-469.

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

16. Ye J, 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; 18 (13): 134.

17. Analysis tool web services from the embl-ebi. 2013. Nucleic Acids Res. 41 (Web Server issue): W597-600.

18. Slater J, Saqib M, Muhammad G, Naureen A, Hussain MH, Asi MN. From |glanders to hendra virus: 125 years of equine infectious diseases.

19. Hampton V, Kaestli M, Mayo M, Choy JL, Harrington G, Richardson L. Melioidosis in birds and *Burkholderia pseudomallei* dispersal, Australia. Emerg Infect Dis. 2011; 17(7): 1310-1312.

20. Gill KM. Agroterrorism: the risks to the united states food supply and national security. US Army Med Department J. 2014; 1: 9-15.

21. Compant S, Nowak J, Coenye T, Clement C, Barka E. Diversity and occurrence of *burkholderia* spp. In the natural environment. FEMS Microbiol Rev. 2008; 32(4): 607-626.

22. Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Deziel E. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechnol. 2007; 17 (9): 1407-1429.

23. Sprague LD, Zachariah R, Neubauer H, Wernery A, Joseph M, Scholz HC, Wernery U. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. BMC Veterinary Research. 2009; 5: 32-37.

24. Losada L, Ronning CM, Deshazer D, Woods D, Fedorova N, Kim HS, Shabalina SA, Pearson TR, Brinkac L, Tan P, Nandi T, Crabtree J, Badger J, Beckstrom-Sternberg S, Saqib M, Schutzer SE, Keim P, Nierman WC. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. Genome Biol Evol. 2010; 2: 102-116.

25. U'Ren JM, Schupp JM, Pearson T, Hornstra H, Friedman CL, Smith KL. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. BMC Microbiol. 2007; 7: 23.

26. Najafi Olya Z, Tadayon K, Ghaderi R. A simplification of the van erth SNP typing method of *Bacillus anthracis*, adaptation of a modern genotyping system to traditional PCR amplification. Medical Lab J. 2015; 9(1): 9.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 3, September 2015

Original Article

Optimization of variable number tandem repeat (VNTR) analysis in the classical PCR machines for typing of *Burkholderia mallei*

Reza Najafpour[1], Nader Mosavari[2], Keyvan Tadayon[2], Elahe Tajbakhsh[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran.
[2]Assistance Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.
[3]Assistance Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Glander is one of the important zoonotic diseases that is usually caused in solipeds including horse, donkey, mule, zebra and rarely in human. In the recent years, many molecular methods have been developed for the genome study of the *Burkholderia mallei.* The present study was aimed to optimize VNTR method on the basis of BM140, BM1367, BM2065 and BM2971 loci in order to molecular typing of *B. mallei* for the first time.

Materials & Methods: In this study, *B. mallei* Razi 325, as a standard strain, was obtained from the microbial archive of the Razi Vaccine and Serum Research Institute. Following DNA extraction and PCR amplification of 4 loci, results of each locus was analysed independently and in different combinations. A special protocol was set in terms of temperature and concentrations of the cotenants (MgCl2 and primers) for each locus.

Results: A comparison of the sequences of our isolate with the standard strains indicated the presence of polymorphism in these loci.

Conclusion: Achievement of a common PCR protocol, which is able to proceed simultaneously four different reactions in one PCR run, was the primary outcome of this research.

Keywords: *Burkholderia mallei*, BM140, BM1367, BM2065, BM2971.

Correspondence to: Nader Mosavari

Tel: +982634502895

E-mail: n.mosavari@rvsri.ac.ir

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 190-199.