Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 2:32 IRST on Monday September 28th 2020

ژنوتایپینگ گونه‌های بورخولدریا سپاسیه در بیماران سیستیک فیبروزیس به روش ژل الکتروفورز در میدان ضربانی

محمد مهدی سلطان دلال[۱و۲*]
سلین تلفیان[۲]، مسعود حاجیا[۱،۳]
عنایت کلانتر[۱،۴]
علیرضا دولت یار دهخوارقانی[۳]
عباس رحیمی فروشانی[۵]
قمرتاج خان بابایی[۶]
ماندانا مبرهن،[۷] مرجان فرزامی[۳]

۱- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۳- آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ایران. ٤- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران. ۵- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ٦- گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ۷- مرکز تحقیقات بیماری‌های تنفسی کودکان، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب‌شناسی
تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۹۲۹۷۱
E-mail: soltanirad34@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۰٤ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲٦ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۱/۱۰

زمینه و هدف: کمپلکس بورخولدریا سپاسیه یکی از عوامل مهم عفونت‌های جدی در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک است. هدف از این مطالعه، ژنوتایپینگ گونه‌های بورخولدریا سپاسیه در بیماران سیستیک فیبروزیس به روش Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) و نسبت تنوع گونه‌های کمپلکس بورخولدریا سپاسیه جدا شده از نمونه‌های بالینی بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، طی ۱۲ ماه در سال ۹۱-۱۳۹۰، ۱۰۰ نمونه ترشحات ریوی از بیماران سیستیک فیبروزیس مراجعه‌کننده به بیمارستان مسیح دانشوری جمع‌آوری شد. پس از تلقیح نمونه‌ها بر روی محیط کشت Burkholderia Cepacia Selective Agar (BCSA) و انکوباسیون، کلنی‌های مشکوک جدا و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی شناسایی شدند. به منظور تایید بیش‌تر با روش لیز قلیایی، DNA باکتری استخراج و با Polymerase Chain Reaction (PCR) و بررسی ژن recA انجام شد. به منظور شناسایی پُلی‌مورفیسم و تنوع تایپی سویه‌های جدا شده بورخولدریا سپاسیه از الکتروفورز ضربان متناوب (PFGE) با استفاده از آنزیم با طیف اثر محدود (XbaI و SpeI) نیز استفاده شد.

یافته‌ها: از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، پنج ایزوله به‌عنوان بورخولدریا سپاسیه شناسایی گردید. اطلاعات به‌دست آمده در الکتروفورز محصولات PCR و مقایسه باندهای ایجاد شده در نمونه‌های بیماران با سوش استاندارد ATCC 25416 بورخولدریا سپاسیه و مقایسه و آنالیز باندهای PFGE با سایز مارکر باکتری Salmonella choleraesuis سروتایپ Braenderup سویهٔ H9812، یکسان بود.

نتیجه‌گیری: وجود الگوی پالس تایپ مشابه در طول مطالعه موید این فرضیه است که عامل شناسایی شده در این مطالعه از یک منبع منتشر شده باشد. بنابراین فرضیه انتقال ارگانیسم فرد به فرد رد و ضرورت دارد که در مطالعات بعدی از منابع محیطی نمونه‌برداری شود.

کلمات کلیدی: بورخولدریا سپاسیه، سیستیک فیبروزیس، الکتروفورز ضربان متناوب.

مقدمه

کمپلکس بورخولدریا سپاسیه Burkholderia Cepacia Complex (BCC) متشکل از ۱۷ گونه است که در سال ۱۹۸۰ به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب و بیماری‌زا در بیماران سیستیک فیبروزیس Cystic Fibrosis (CF) و گرانولوماتوز مزمن شناخته شد.[۱و۲] این ارگانیسم‌ها از پاتوژن‌هایی است که بیش‌تر مسئول شیوع عفونت بوده و از مراکز بهداشتی سراسر دنیا بارها گزارش می‌گردد، همواره به‌عنوان یک ارگانیسم با مقاومت دارویی بالا در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد.[۳-۵] بورخولدریا سپاسیه در ارتباط با شیوع بیماری‌هایی مانند

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 2:32 IRST on Monday September 28th 2020

عفونت‌های خونی، دستگاه تنفسی، دستگاه ادراری و بیش‌تر مواقع در عفونت‌های بیمارستانی و واگیردار و در آلوده شدن مواد ضدعفونی کننده و محلول‌های بیهوشی مطرح است.[۶و۷] شدت عفونت یا کلونیزاسیون توسط بورخولدریا سپاسیه برای بیماران خاص، متفاوت است. به‌طور کلی کلونیزاسیون ریوی ۵۰٪ حیات را کاهش می‌دهد. بررسی‌های مولکولی و اپیدمیولوژیکی، انتقال از طریق فرد به فرد و عفونت بیمارستانی را تأیید می‌کند.[۸و۹] لذا تشخیص سریع و حذف به‌موقع آن از منابع منتشر شونده ضروری است. روش تعیین ژنوتایپ‌های مسئول به‌خوبی می‌تواند برای این منظور مورد استفاده قرار گیرد.

Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) یکی از بهترین روش‌هایی است که برای تیپ‌بندی و مطالعات اپیدمیولوژی و در زمینه‌های مختلف مانند بیولوژی، بیوشیمی، بیوتکنولوژی، پزشکی، تشخیص بالینی در مناطق مختلف کاربرد دارد. این روش با قدرت تکرارپذیری و افتراق بالایی که دارد برای تمام پاتوژن‌های انسانی قابل استفاده می‌باشد و روشی برای یافتن پلی‌مورفیسم در قطعات محدودگر DNA ژنومی است. در این روش DNA ژنومی به تعدادی قطعات محدود شونده در روش بسیار خاص و قابل تکثیر بریده می‌شود. این قطعات DNA به‌طور معمول برای الکتروفورز ژل آگاروز معمولی بسیار درشتند، در عوض آن‌ها می‌توانند به‌طور مؤثر مطابق اندازهٔ خود توسط فرآیندی به نام PFGE تفکیک شوند. PFGE، انتقال افتراقی قطعات بزرگ DNA از میان ژل آگاروز توسط تغییر هدایت میدان الکتریکی به طور دایم در طی الکتروفورز را تسهیل می‌دهد.[۱۰و۱۱]

Mahenthiralingam، عفونت با ژنوموارهای کمپلکس بورخولدریا سپاسیه در بیماران سیستیک فیبروزیس را با ژن recA مورد بررسی قرار داد. هدف او تعیین ژنوموار خاصی بود که در انتقال و شدت بیماری‌زایی نقش داشت.[۱۲] Woods، ۹ بیمار سیستیک فیبروزیس را از ۵۳ بیمار باکتریمی حاصل از کمپلکس بورخولدریا سپاسیه با آنالیزهای Polymerase Chain Reaction (PCR) بر پایه recA و 16S rDNA مورد بررسی قرار داد و تایپینگ سویه‌ها با روش PFGE صورت گرفت.[۱۳] Biddic برای بررسی شیوع گونه‌های بورخولدریا در بیماران سیستیک فیبروزیس از آنالیز ژنوتیپی rep-PCR و PFGE استفاده کرد. از ۳۶۰ نمونه خلط، ۷ بورخولدریا سپاسیه ژنوموار I یافت. او به این نتیجه رسید که پراکندگی بورخولدریا سپاسیه در بیماران سیستیک فیبروزیس نسبت به بورخولدریا سپاسیه بیش‌تر است.[۱۴]

هدف ما در این مطالعه، شناسایی و تعیین فراوانی بورخولدریا سپاسیه در بیماران سیستیک فیبروزیس با روش کشت و PCR هم‌چنین تعیین انواع ژنوتایپ با روش استاندارد طلایی PFGE.

روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی طی ۱۲ ماه در سال ۹۱-۱۳۹۰، ۱۰۰ نمونه ترشحات ریوی از بیماران مشکوک به سیستیک فیبروزیس مراجعه‌کننده به بیمارستان ریوی مسیح دانشوری جمع‌آوری شد. بیمارانی به‌عنوان عفونت مزمن با کمپلکس بورخولدریا سپاسیه در نظر گرفته می‌شدند، که سه کشت طی شش ماه مثبت می‌شد.

شناسایی فنوتیپی: پس از دریافت هر نمونه از مراکز درمانی با هدف احیای مجدد باکتری‌های موجود در آن، در محیط Brain Heart Infusion Broth (BHIB) کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون توسط لوپ استریل یک قطره از سوسپانسیون میکروبی حاصل روی محیط بلادآگار کشت شد. در ادامه پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت بررسی فنوتیپی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز و کشت روی محیط اختصاصی Burkholderia Cepacia Selective Agar (BCSA) انجام گردید.[۱۵]

آزمون‌های تاییدی- آزمون API 20NE: روی سویه ATCC25416 با صرف زمان کم‌تر و هم‌چنین کاهش خطاهای احتمالی ابزاری و انسانی، برای شناسایی سویه‌های بورخولدریا سپاسیه انجام شد.[۱۶] تشخیص بورخولدریا سپاسیه با روش PCR: تمامی نمونه‌های مثبت به جهت تایید دوباره توسط روش PCR نیز آزمایش گردیدند. از این روی نمونه‌ها مثبت پس از استخراج (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, USA) برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. سکانس‌های اختصاصی گروه و گونه بورخولدریا سپاسیه بر اساس گزارش Lynch استفاده گردید[۱۷] (جدول ۱) و در نهایت توسط الکتروفورز، محصولات مورد آنالیز قرار گرفت.

تعیین پالس تایپ سویه‌های شناسایی شده با استفاده از روش PFGE: تهیه پلاگ‌های باکتریای، لیز پلاگ‌های باکتریایی، شستشوی پلاگ و

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 2:32 IRST on Monday September 28th 2020

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این طرح

Product size	Species	Sequence	Primer	Target
429(bp)	All	ATGACCAATCCGACCGATCTCAA	BCC(F)	**recA**
		TCAGTGCTTGCGITNIGGGCAGTT	BCC(R)	
117(bp)	BCC (Group K)	GGCNGAAGACGTCTACCGG	BKF(F)	**recA**
		TCGAAGTTGCTGCGCGAC	BKF(R)	

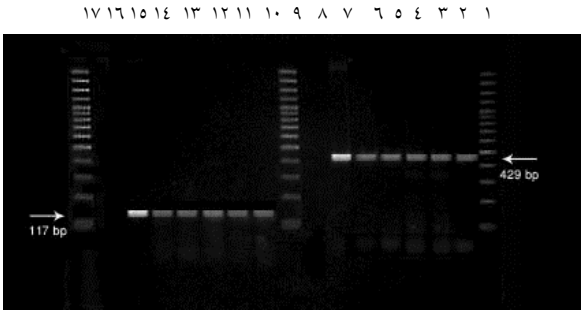
هضم DNA ژنومی با آنزیم BcuI (SpeI) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) صورت گرفت. الکتروفورز بر اساس پروتکل استاندارد PFGE و به وسیله سیستم CHEF Mapper system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) به مدت ۲۰/۲ ساعت در Tris-borate-EDTA (TBE) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA، Initial switch time=5.5s, Final switch time=52.5 و زاویه °۱۲۰، دمای T=۱٤ °C انجام شد.[۱۸]

یافته‌ها

نتیجه کشت روی محیط اختصاصی BCSA: در این بررسی از مجموع نمونه‌های آزمایش شده پنج نمونه توسط روش کشت با محیط اختصاصی BCSA و API 20NE kit (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) تعیین هویت و توسط روش PCR تایید گردیدند (جدول ۲). سه بیمار دارای سه کشت (عفونت مزمن) و دو بیمار تنها یک کشت مثبت داشتند.

نتایج به‌دست آمده از PCR: بعد از انجام مراحل استخراج DNA باکتری (روی پنج نمونه بورخولدریا سپاسیه)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر روی DNA های استخراج شده انجام شد و نمونه‌ها برای انجام الکتروفورز روی ژل آگاروز بُرده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس برای مشاهده باندهای حاصل، توسط دستگاه ایلومیناتور از ژل عکس گرفته شد. با انجام الکتروفورز محصولات PCR، باندهایی با وزن مولکولی مناسب در مقایسه با کنترل مثبت بورخولدریا سپاسیه و پلکان مشاهده شده که وجود جنس بورخولدریا (٤۲۹ bp) و گروه K کمپلکس بورخولدریا سپاسیه را اثبات کرد (شکل ۱).

نتایج به‌دست آمده از PFGE: بعد از مشاهده باندهای جنس و



شکل ۱: نتایج به‌دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR. (۱، ۹، ۱۷= پلکان)، (۸، ۱٦= کنترل منفی)، (۷، ۱٥= کنترل مثبت (سوش استاندارد ATCC 25416)، (۲، ۳، ٤، ٥، ٦= جنس بورخولدریا (bp) ٤۲۹)، (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱٤= گروه K بورخولدریا سپاسیه (bp) ۱۱۷).

گونه بورخولدریا سپاسیه به‌منظور شناسایی پُلی‌مورفیسم در قطعات محدود شونده DNA ژنومی، الکتروفورز ضربان متناوب PFGE انجام شد. با اطلاعات به‌دست آمده در الکتروفورز و مقایسه و آنالیز باندهای PFGE ایجاد شده در نمونه‌های بیماران با سوش استاندارد ATCC 25416 بورخولدریا سپاسیه با سایز مارکر باکتری Salmonella choleransuis سروتایپ Braenderup سویهٔ H9812، همه تایپ‌ها از خود یک الگوی یکسان نشان دادند که موید انتشار آنان از یک منبع واحد می‌باشد (شکل ۲).

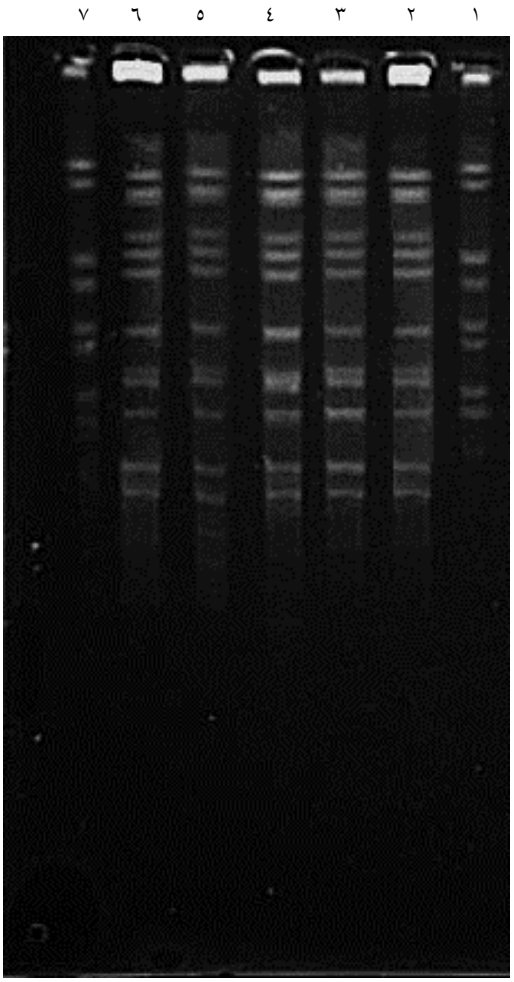
بحث

فراوانی تعیین شده از سیستیک فیبروزیس در این مطالعه ٥٪ بود. این فراوانی در گزارشات متفاوت متغیر می‌باشد. تفاوت‌های بسیاری در فراوانی عفونت اعضای مجموعه بورخولدریا سپاسیه در کشورهای مختلف و حتی در نواحی مختلف یک کشور گزارش شده

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 2:32 IRST on Monday September 28th 2020

جدول ۲: آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته روی سوش استاندارد BCC

باکتری	رنگ‌آمیزی گرم	پیگمان	اکسیداز	حرکت	اندل	H_2S in KIA	TSI	سیترات	لیزین	آرژنین	ارنیتین	لاکتوز	مالتوز	مانیتول	دی‌ان آز	پلی میکسین
بورخولدر یا سپاسیه استاندارد (ATCC25 416)	باسیل گرم منفی	−	+	+	−	−	قلیا/قلیا	ضعیف −	+	−	+	+	+	+	−	مقاوم
سوش جدا شده	باسیل گرم منفی	−	+	+	−	−	قلیا/قلیا	ضعیف −	+	−	+	+	+	+	−	مقاوم



شکل ۲: نتایج به‌دست آمده از PFGE. (۱، ۷= سایز مارکر، باکتری Salmonella choleransuis)، (۲، ۳، ٤، ٥، ٦= نمونه‌های بورخولدریا سپاسیه)

است.[۲و۱۲و۱۳و۱۹] این تفاوت‌ها شاید ناشی از ضعف سیستم‌های تشخیصی یا تفاوت در فراوانی عفونت در کشورهای مختلف است، هرچند امروزه با رواج استفاده از محیط‌های انتخابی و روش‌های مولکولی، دقت شناسایی این باکتری‌ها نیز افزایش یافته است.[۱۳و۱۵و۲۰] مقاومت ذاتی و اکتسابی بورخولدریا سپاسیه به عوامل ضد سودوموناسی قوی، سبب آن شده است که هیچ درمان آنتی‌بیوتیکی موثری برای این باکتری وجود نداشته باشد.[۲۱] شناسایی نادرست یا ناکامل یک اُرگانیسم به‌عنوان بورخولدریا سپاسیه می‌تواند به گروه بندی نادرست بیماران مبتلا منجر گردد. با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در زمینه همه‌گیری عفونت‌های بورخولدریایی در سطح جهان صورت گرفته است (به ویژه در اروپا و امریکای شمالی)، این باکتری ها هنوز موارد فراوانی از مرگ و میر را در بیماران سیستیک فیبروزیس موجب می‌شوند.[۹و۱٤]

خصوصیات بیوشیمیایی از قابلیت اندکی برای شناسایی و افتراق اعضای مجموعه بورخولدریا سپاسیه برخوردارند و نتایج این آزمون‌ها، حتی با استفاده از سیستم‌های تشخیص تجاری نیز نمی‌تواند با اطمینان، این باکتری‌ها را شناسایی کند.[۱۵] در این مطالعه با انتخاب محیط کشت و روش مولکولی مناسب و با دقت کامل پنج باکتری بورخولدریا سپاسیه جدا شد که هر پنج نمونه از نظر گونه یکسان بودند. به‌نظر می‌رسد که متغیرهای مورد استفاده در این مطالعه برای بهینه‌سازی روش میدان ضربانی از اساسی‌ترین متغیرها در راه‌اندازی یک روش کارآمد می‌باشند. بنابراین با رعایت نکات گفته شده، این

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 2:32 IRST on Monday September 28th 2020

روش مولکولی بیش از گذشته به محققین در مطالعات اپیدمیولوژی و مقایسه بین سوش‌های مختلف کمک خواهد کرد. با انجام استخراج DNA باکتری با روش لیز قلیایی، جهت تکثیر DNA باکتری، از روش بیولوژی مولکولی بر پایه recA-PCR و پرایمرهای BCC و BKF روش PFGE تکرارپذیری بالایی دارد و با تغییر در زمان متناوب، افزایش قدرت تمایز در طیف اندازه‌های جدا شده امکان‌پذیر می‌گردد.

این روش بسیار حساس بوده و کوچک‌ترین تغییری در پارامترهای وابسته به آن باعث عدم نتیجه‌گیری درست می‌شود.[۱۱و۱۷] با توجه به این موارد در مطالعه حاضر سعی شده است با استانداردسازی بیش‌تر این روش و برطرف کردن اشکالات تکنیکی موجود در انجام آن به نتایج دقیق‌تری برای مقایسه سوش‌های مختلف در مطالعات اپیدمیولوژی دست یافت. به‌کارگیری روش PFGE به منظور تعیین هویت پالس تایپ‌های درگیر در بیماری یک ابزار قوی به منظور ارتقا پژوهش‌های مورد نیاز برای شیوع عفونت‌های بیمارستانی ناشی از BCC می‌باشد،[۱۸] اگرچه ضروریست یافته‌های بالینی با نتایج مطالعه بر روی منابع محیطی آلوده‌کننده که ارگانیسم از آن انتشار می‌یابد هم‌زمان باشد تا بتوان نسبت به منبع انتشار قضاوت صحیح داشت. بنابراین ضروریست در هر مطالعه بعدی هم‌زمان از منابعی که احتمال انتشار ارگانیسم از آن می‌رود نیز آزمایش صورت پذیرد.

این احتمال وجود دارد که عامل شناسایی شده در این مطالعه از یک منبع منتشر شده باشد. وجود الگوی پالس تایپ مشابه در طول مطالعه موید این فرضیه می‌باشد. از آن‌جا که بیماران در فواصل زمانی متفاوت در طول یک سالی که مطالعه صورت گرفته است آلوده شده‌اند، فرضیه انتقال ارگانیسم از انسان به انسان مطرح نمی‌باشد و ضروریست از منابع محیطی در مطالعات بعدی نیز نمونه‌گیری صورت پذیرد.

سپاسگزاری: این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۱۹۶۶ مورخ ۱۳۹۰/۵/۳ می‌باشد. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌های طرح را تقبل نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم. بدینوسیله از زحمات پرسنل بیمارستان ریوی مسیح دانشوری جهت همکاری در نمونه‌برداری و از آزمایشگاه مرجع سلامت جهت انجام آزمایشات PCR و PFGE تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 2007;153(Pt 4):917-23.
2. Reik R, Spilker T, LiPuma JJ. Distribution of Burkholderia cepacia complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2926-8.
3. Cohen AL, Ridpath A, Noble-Wang J, Jensen B, Peterson AM, Arduino M, et al. Outbreak of Serratia marcescens bloodstream and central nervous system infections after interventional pain management procedures. *Clin J Pain* 2008;24(5):374-80.
4. Gröbner S, Heeg P, Autenrieth IB, Schulte B. Monoclonal outbreak of catheter-related bacteraemia by Ralstonia mannitolilytica on two haemato-oncology wards. *J Infect* 2007;55(6):539-44.
5. Lee HC, Lee NY, Chang CM, Chou CY, Wu YH, Wang LR, et al. Outbreak of Acinetobacter baumannii bacteremia related to contaminated morphine used for patient-controlled analgesia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28(10):1213-7.
6. Zeeshan M, Aziz T, Naqvi F. Recurrent urinary tract infection by Burkholderia cepacia in a live related renal transplant recipient. *J Pak Med Assoc* 2012;62(5):496-8.
7. Ángeles-Garay U, Zacate-Palacios Y, López-Herrera JR, Hernández-Sánchez EA, Silva-Sánchez J, Ascencio-Montiel Ide J. Hospital outbreak of urinary tract infections by lubricant gel contaminated with Burkholderia cepacia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2012;50(6):615-22.
8. Ghazal SS, Al-Mudaimeegh K, Al Fakihi EM, Asery AT. Outbreak of Burkholderia cepacia bacteremia in immunocompetent children caused by contaminated nebulized sulbutamol in Saudi Arabia. *Am J Infect Control* 2006;34(6):394-8.
9. Meghdas I, Loïez C, Baïda N, Dabboussi F, Hamze M, Husson MO, et al. Epidemiology of infections associated to "Burkholderia cepacia complex" in the course of cystic fibrosis. *Arch Pediatr* 2004;11(4):360-6.
10. Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Villalón P, Garrido N, Rubio V, Saéz-Nieto JA. Identification, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of genomovars of the Burkholderia cepacia complex in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(12):3385-96.
11. Coenye T1, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of Burkholderia cepacia genomovar III. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3300-7.
12. Mahenthiralingam E1, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, et al. Infection with Burkholderia cepacia complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace Burkholderia multivorans. *Clin Infect Dis* 2001;33(9):1469-75.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 2:32 IRST on Monday September 28th 2020

13. Woods CW, Bressler AM, LiPuma JJ, Alexander BD, Clements DA, Weber DJ, et al. Virulence associated with outbreak-related strains of Burkholderia cepacia complex among a cohort of patients with bacteremia. *Clin Infect Dis* 2004;38(9):1243-50.
14. Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Evidence of transmission of Burkholderia cepacia, Burkholderia multivorans and Burkholderia dolosa among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* 2003;228(1):57-62.
15. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP. Identification of Burkholderia cepacia isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 1997;35(3):614-9.
16. Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. Phenotypic methods for determining genomovar status of the Burkholderia cepacia complex. *J Clin Microbiol* 2001;39(3):1073-8.
17. Lynch KH, Dennis JJ. Development of a species-specific fur gene-based method for identification of the Burkholderia cepacia complex. *J Clin Microbiol* 2008;46(2):447-55.
18. Tenover FC1, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
19. Martina P1, Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, et al. Genetic diversity of Burkholderia contaminans isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. *J Clin Microbiol* 2013;51(1):339-44.
20. Drevinek P, Mahenthiralingam E. Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(7):821-30.
21. Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Benge LC, Gaskin S, Livermore DM. Type characterisation and antibiotic susceptibility of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol* 1996;44(3):203-10.

TUMJ Tehran University Medical Journal, May 2014; Vol. 72, No. 2: 72-78 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 2:32 IRST on Monday September 28th 2020

Identification of Burkholderia cepacia in patients with cystic fibrosis by pulsed-field gel electrophoresis

Mohammad Mehdi Soltan Dallal Ph.D.[1,2*]
Celin Telefian M.Sc.[2]
Massoud Hajia Ph.D.[1,3]
Enayat Kalantar Ph.D.[1,4]
Ali Reza Dolatyar Dehkharghani M.Sc.[3]
Abbas Rahimi Forushani Ph.D.[5]
Qamartaj Khanbabaei M.D.[6]
Mandana Mobarhan M.Sc.[7]
Marjan Farzami M.D.[3]

1- Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Division Bacteriology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Iranian Reference Health Laboratory, Tehran, Iran.
4- Department of Microbiology, School of Medicin, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
5- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
6- Department of. Pediatrics, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
7- Pediatric Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 88992971
E-mail: soltanirad34@yahoo.com

Abstract

Received: 26 Aug. 2013 Accepted: 15 Feb. 2014 Available online: 01 Apr. 2014

***Background*:** Complex of Burkholderia cepacia is one of the main and serious causes of infections in cystic fibrosis patients that can be highly transmissible. Small hospital outbreaks are frequent and are usually due to a single contaminated environmental source. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is widely used to identify the strain emission sources in cystic fibrosis patients. The aim of this research was to study genotyping of Burkholderia cepacia using PFGE method, and to evaluate diversity complex of clinical strains isolated from cystic fibrosis patients.

***Methods*:** This is a descriptive study, in which 100 pulmonary secretion specimens of cystic fibrosis patients admitted in Masih Daneshvari Hospital, Tehran Iran in period of 12 months 2012 to 2013 were collected. The specimens were cultured on BCSA plate's. After incubation suspected colonies were isolated and identified by biochemical and phenotypic method. All samples were checked by API system (API20NE) and by specific PCR method for genus Bulkhorderia and Bcc as well. DNA was extracted by alkaline lysis method and confirmed by PCR analysis of recA genes. Genetic diversity of isolate was performed by PFGE analysis according to Pulsenet guideline by using XbaI, SpeI as restriction enzyme which digests infrequently among the Burkholderia cepacia genome.

***Results*:** Out of 100 samples five were identified as Burkholderia cepacia. It is obviously different at variously reports. The electrophoresis data of PCR products and comparison of band in samples from patients with standard strain ATCC 25416 Burkholderia cepacia and compare and analyse the PFGE size marker bands of Salmonella choleransuis serotype Braenderup H9812 strain, were the same.

Conclusion: Application of PFGE and identification of pulse-type is a potential tool to enhance the investigation of apparent nosocomial outbreaks of B.cepacia. Similar type of pulse patterns was observed in this study means that all of infection has been from one source; therefore the hypothesis of transferring person to person will be rejected. Base on these results environmental sources sampling should be considered in future investigation.

Keywords: burkholderia cepacia complex, cystic fibrosis, pulsed-field gel electrophoresis.