

ژنوتایپینگ گونه‌های بورخولدريا سپاسيه در بيماران سيستيك فيبروزيس به روش ژل الکتروفورز در میدان ضربانی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۱/۱۰

زمینه و هدف: کمپلکس بورخولدريا سپاسيه یکی از عوامل مهم عفونت‌های جدی در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک است. هدف از این مطالعه، ژنوتایپینگ گونه‌های بورخولدريا سپاسيه در بیماران سیستیک فیبروزيس به روش Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) و نسبت تنوع گونه‌های کمپلکس بورخولدريا سپاسيه 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 فیبروزيس 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 پلی‌مورفيسم و تنوع تایپی سویه‌های جدا شده بورخولدريا سپاسيه از الکتروفورز ضربان متناوب (PFGE) با استفاده از آنزیم با طیف اثر محدود (SpeI و XbaI) نیز استفاده شد.

یافته‌ها: از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، پنج ایزوله به‌عنوان بورخولدريا سپاسيه شناسایی گردید. اطلاعات به‌دست آمده در الکتروفورز محصولات PCR و مقایسه باندهای ایجاد شده در نمونه‌های بیماران با سوش استاندارد ATCC 25416 بورخولدريا سپاسيه و مقایسه و آنالیز باندهای PFGE با سائز مارکر باکتری Salmonella choleraesuis سروتایپ Braenderup سویه 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 ارگانيسم فرد به فرد رد و ضرورت دارد که در مطالعات بعدی از منابع محیطی نمونه‌برداری شود.

کلمات کلیدی: بورخولدريا سپاسيه، سيستیک فيبروزيس، الکتروفورز ضربان متناوب.

محمد مهدی سلطان دلال^{۱*}

سلین تلفیان^۲، مسعود حاجیا^۳

عنایت کلانتر^۴

علیرضا دولت یار دهخوارقانی^۳

عباس رحیمی فروشانی^۵

قمرتاج خان بابایی^۶

ماندانا مبرهن،^۷ مرجان فرزانی^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- آزمايشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ایران. ۴- 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. ۶- 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: ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱
E-mail: soltanirad34@yahoo.com

مقدمه

Fibrosis (CF) و گرانولوماتوز مزمن شناخته شد.^۱ این ارگانيسم‌ها از پاتوژن‌هایی است که بیش‌تر مسئول شیوع عفونت بوده و از مراکز بهداشتی سراسر دنیا بارها گزارش می‌گردد، همواره به‌عنوان یک ارگانيسم با مقاومت دارویی بالا در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد.^{۲-۴} بورخولدريا سپاسيه در ارتباط با شیوع بیماری‌هایی مانند

کمپلکس بورخولدريا سپاسيه Burkholderia Cepacia Complex (BCC) متشکل از ۱۷ گونه است که در سال ۱۹۸۰ به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب و بیماری‌زا در بیماران سیستیک فیبروزيس Cystic

سپاسيه ژنوموار I يافت. او به اين نتيجه رسيد که پراکندگي بورخولدريا سپاسيه در بيماران سيستیک فيبروزيس نسبت به بورخولدريا سپاسيه بيش تر است.^{۱۴}

هدف ما در اين مطالعه، شناسايی و تعيين فراوانی بورخولدريا سپاسيه در بيماران سيستیک فيبروزيس با روش کشت و PCR هم‌چنين تعيين انواع ژنوتایپ با روش استاندارد طلايی PFGE.

روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی طی ۱۲ ماه در سال ۹۱-۱۳۹۰، ۱۰۰ نمونه ترشحات ریوی از بيماران مشکوک به سيستیک فيبروزيس مراجعه‌کننده به بيمارستان ریوی مسیح دانشوری جمع‌آوری شد. بيمارانی به‌عنوان عفونت مزمن با کمپلکس بورخولدريا سپاسيه در نظر گرفته می‌شدند، که سه کشت طی شش ماه مثبت می‌شد.

شناسايی 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 انکوباسيون توسط لوپ استریل یک قطره از سوسپانسیون میکروبی حاصل روی محیط بلاداگار کشت شد. در ادامه پس از انکوباسيون 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 سويه ATCC25416 با صرف زمان کم‌تر و هم‌چنين کاهش خطاهای احتمالی ابزاري و انسانی، برای شناسايی سويه‌های بورخولدريا سپاسيه انجام شد.^{۱۶} تشخیص بورخولدريا سپاسيه با روش PCR: تمامی نمونه‌های مثبت به جهت تایید دوباره توسط روش PCR نیز آزمایش گردیدند. از این روی نمونه‌ها مثبت پس از استخراج PCR (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, USA) برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. سکانس‌های اختصاصی گروه و گونه بورخولدريا سپاسيه بر اساس گزارش Lynch استفاده گردید^{۱۷} (جدول ۱) و در نهایت توسط الکتروفورز، محصولات مورد آنالیز قرار گرفت.

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

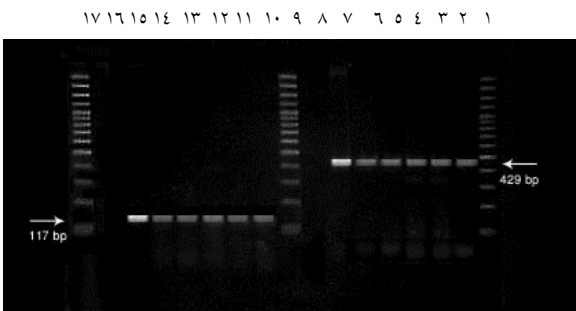
عفونت‌های خونی، دستگاه تنفسی، دستگاه ادراری و بيش تر مواقع در عفونت‌های بيمارستانی و واگیردار و در آلوده شدن مواد ضد‌عفونی کننده و محلول‌های بیهوشی مطرح است.^{۱۸} شدت عفونت یا کلونیزاسيون توسط بورخولدريا سپاسيه برای بيماران خاص، متفاوت است. به‌طور کلی کلونیزاسيون ریوی ۵۰٪ حیات را کاهش می‌دهد. بررسی‌های مولکولی و اپیدمیولوژیکی، انتقال از طریق فرد به فرد و عفونت بيمارستانی را تأیید می‌کند.^{۱۹} 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 اندازه خود توسط فرآیندی به نام PFGE تفکیک شوند. PFGE، انتقال افتراقی قطعات بزرگ DNA از میان ژل آگاروز توسط تغییر هدایت میدان الکتريکی به طور دایم در طی الکتروفورز را تسهیل می‌دهد.^{۱۱،۱۰}

Mahenthiralingam، عفونت با ژنوموارهای کمپلکس بورخولدريا سپاسيه در بيماران سيستیک فيبروزيس را با ژن *recA* مورد بررسی قرار داد. هدف او تعیین ژنوموار خاصی بود که در انتقال و شدت بيماری‌زایی نقش داشت.^{۱۲} Woods، ۹ بيمار سيستیک فيبروزيس را از ۵۳ بيمار باکتریمی حاصل از کمپلکس بورخولدريا سپاسيه با آنالیزهای Polymerase Chain Reaction (PCR) بر پایه *recA* و 16S rDNA مورد بررسی قرار داد و تایپینگ سويه‌ها با روش PFGE صورت گرفت.^{۱۳} Bidic برای بررسی شیوع گونه‌های بورخولدريا در بيماران سيستیک فيبروزيس از آنالیز ژنوتیپی *rep-PCR* و PFGE استفاده کرد. از ۳۶۰ نمونه خلط، ۷ بورخولدريا

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این طرح

| Product size | Species | Sequence | Primer | Target |
|--------------|---------------|---|------------------|--------|
| 429(bp) | All | ATGACCAATCCGACCGATCTCAA TCAGTGCTTGCGITNIGGGCAGTT | BCC(F) BCC(R) | recA |
| 117(bp) | BCC (Group K) | GGCNGAAGACGTCTACCGG TCGAAGTTGCTGC GCGAC | BKF(F) BKF(R) | recA |



شکل ۱: نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR. (۱، ۹، ۱۷ = پلکان)، (۸، ۱۶ = کنترل منفی)، (۷، ۱۵ = کنترل مثبت (سوش استاندارد ATCC 25416)، (۲، ۳، ۴، ۵، ۶ = جنس بورخولدريا (۴۲۹ bp)، (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ = گروه K بورخولدريا سپاسيه (۱۱۷ bp).

گونه بورخولدريا سپاسيه به منظور شناسایی پلی مورفيسم در قطعات محدود شونده DNA ژنومی، الکتروفورز ضربان متناوب PFGE انجام شد. با اطلاعات به دست آمده در الکتروفورز و مقایسه و آنالیز باندهای PFGE ایجاد شده در نمونه‌های بیماران با سوش استاندارد ATCC 25416 بورخولدريا سپاسيه با سایر مارکر باکتری Salmonella choleraesuis سروتایپ Braenderup سویه 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 سیستمیک فیروزیس در این مطالعه ۵٪ بود. این فراوانی در گزارشات متفاوت متغیر می‌باشد. تفاوت‌های بسیاری در فراوانی عفونت اعضای مجموعه بورخولدريا سپاسيه در کشورهای مختلف و حتی در نواحی مختلف یک کشور گزارش شده

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) 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=۱۴° 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'Étoile, 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 به دست آمده از PCR: بعد از انجام مراحل استخراج DNA باکتری (روی پنج نمونه بورخولدريا سپاسيه)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر روی DNA های استخراج شده انجام شد و نمونه‌ها برای انجام الکتروفورز روی ژل آگاروز برده 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 بورخولدريا سپاسيه و پلکان مشاهده شده که وجود جنس بورخولدريا (۴۲۹ bp) و گروه K کمپلکس بورخولدريا سپاسيه را اثبات کرد (شکل ۱).

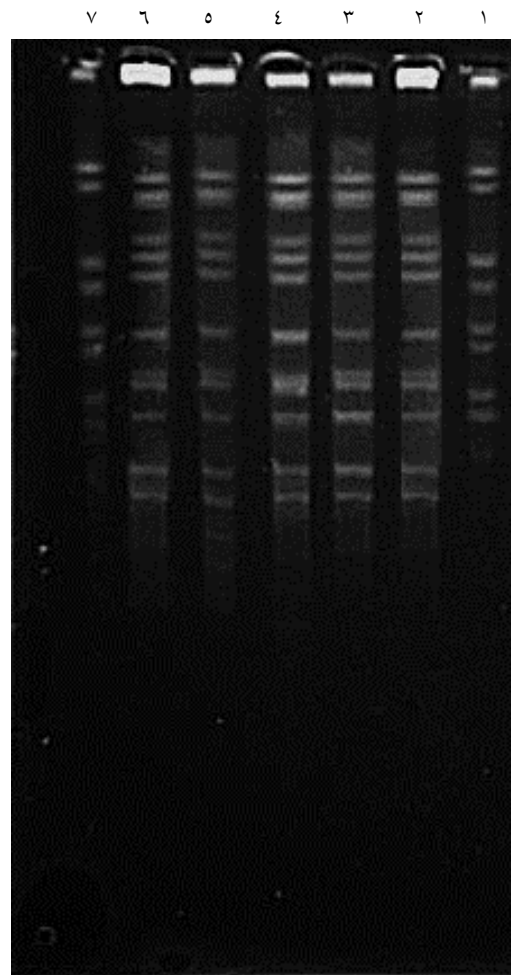
نتایج به دست آمده از PFGE: بعد از مشاهده باندهای جنس و

جدول ۲: آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته روی سوش استاندارد BCC

| پلی میکسین | دی‌ان‌آز | ماینول | مالتوز | لاکتوز | ارنیتین | آرژنین | لیزین | سیترات | TSI | H ₂ S in KIA | اندل | اکسیداز | حرکت | پیگمان | رنگ‌آمیزی گرم | باکتری |
|------------|----------|--------|--------|--------|---------|--------|-------|--------|-----------|-------------------------|------|---------|------|--------|----------------|--|
| | - | + | + | + | + | - | + | ضعیف | قلیا/قلیا | - | - | + | + | - | باسیل گرم منفی | بورخولدر یا سپاسیه استاندارد (ATCC25416) |
| مقاوم | | | | | | | | - | | | | | | | | |
| | - | + | + | + | + | - | + | ضعیف | قلیا/قلیا | - | - | + | + | - | باسیل گرم منفی | سوش جدا شده |
| مقاوم | | | | | | | | - | | | | | | | | |

است. ۱۹ و ۲۰ و ۱۳ و ۱۹ 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. ۱۳ و ۲۰ و ۱۳ مقاومت ذاتی و اکتسابی بورخولدريا سپاسيه 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 آرگانیزم به‌عنوان بورخولدريا سپاسيه می‌تواند به گروه بندی نادرست بیماران مبتلا منجر گردد. با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در زمینه همه‌گیری عفونت‌های بورخولدريایی در سطح جهان صورت گرفته است (به ویژه در اروپا و امریکای شمالی)، این باکتری‌ها هنوز موارد فراوانی از مرگ و میر را در بیماران سیستیک فیبروزیس موجب می‌شوند. ۱۴ و ۹

خصوصیات بیوشیمیایی از قابلیت اندکی برای شناسایی و افتراق اعضای مجموعه بورخولدريا سپاسيه 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 بورخولدريا سپاسيه 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



شکل ۲: نتایج به‌دست آمده از PFGE. (۱) = ۷ سایز مارکر، باکتری Salmonella (choleraesuis)، (۲، ۳، ۴، ۵، ۶) = نمونه‌های بورخولدريا سپاسيه

انتشار قضاوت صحیح داشت. بنابراین ضروریست در هر مطالعه بعدی هم‌زمان از منابعی که احتمال انتشار ارگانیزم 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 مویید این فرضیه می‌باشد. از آن‌جا که بیماران در فواصل زمانی متفاوت در طول یک سالی که مطالعه صورت گرفته است آلوده شده‌اند، فرضیه انتقال ارگانیزم 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 و تقدیر و تشکر می‌شود.

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.^{۱۱، ۱۷} با توجه به این موارد در مطالعه حاضر سعی شده است با استانداردهای 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 ارگانیزم از آن انتشار می‌یابد هم‌زمان باشد تا بتوان نسبت به منبع

References

- Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 2007;153(Pt 4):917-23.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ghazal SS, Al-Mudaimeegh K, Al Fakih EM, Aseriy 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.
- Meghdas I, Loítez C, Baída 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.
- 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.
- 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.
- Mahenthalingam 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.

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, Mahenthalingam 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 PI, 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, Mahenthalingam 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, Bengel 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.

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 Khanbabaie 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 Medicine, 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 *Burkholderia* 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 choleraesuis* 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.