مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۹ شماره ۳ مرداد و شهریور ۱۳۹٤، ۲۵۵-۲٤۹

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی باکتری بورخولدریا سپاسیه از ترشحات تنفسی بیماران سیستیک فیبروزیس

سلین تلفیان[۱]، دکتر عنایت اله کلانتر[۲]، دکتر محمد مهدی سلطان دلال[۳]

چکیده

زمینه و هدف: بیماری سیستیک فیبروزیس، یک اختلال شایع وراثتی و اتوزومی مغلوب است. یکی از این عوامل، بورخولدریا سپاسیه است که انتقال آن از طریق استفاده از لوازم مشترک در بخش بستری بیماران سیستیک فیبروزیس در بیمارستان صورت می‌گیرد. هدف این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری بورخولدریا سپاسیه از ترشحات تنفسی بیماران سیستیک فیبروزیس مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری است.

روش بررسی: در یک مطالعه توصیفی تعداد ۱۰۰ نمونه ترشحات ریوی مراجعین بیمارستان مسیح دانشوری که مبتلا به سیستیک فیبروزیس بودند، جمع آوری شد. نمونه‌ها بر روی دو محیط کشت مک کانکی آگار و(BCSA یا Burkholderia cepacia selective agar) تلقیح شدند. پس از یک دوره انکوباسیون ٤۸ ساعته در دمای $۳۵^{o}C$، کلنی‌های مشکوک جدا و با استفاده از تست های فنوتیپی و بیوشیمیایی TSI آگار، محیط سیمون سیترات، تست حرکت واندول، MR_VP، اکسیداسیون– تخمیر(OF)، آزمون دکربوکسیلاسیون آرژینین ـ اورنیتین ـ لایزین، آزمون Dnase، و مقاومت به پلی میکسین شناسایی شدند.

یافته‌ها: در این پژوهش از ۱۰۰ نمونه ترشحات مورد بررسی، تعداد ۵ مورد ایزوله به عنوان بورخولدریا سپاسیه با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. اگرچه نمونه مثبتی توسط محیط کشت افتراقی مک کانکی آگار بدست نیامد.

نتیجه‌گیری: جهت جداسازی بورخولدریا سپاسیه در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، بکار گیری محیط کشت اختصاصی BCSA از اهمیت خاصی برخوردار است. همچنین وجود ۵٪ بورخولدریا سپاسیه در عفونت‌های سیستیک فیبروزیس در این مطالعه، بیانگر نیاز به استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و روش‌های حساس‌تر در تشخیص این باکتری دارد.

واژه‌های کلیدی: بورخولدریا سپاسیه، سیستیک فیبروزیس، ترشحات تنفسی

* نویسنده مسئول :
دکتر محمد مهدی سلطان دلال ؛
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email :
Soltanda@sina.tums.ac.ir

- دریافت مقاله : اردیبهشت ۱۳۹٤ پذیرش مقاله : مرداد ۱۳۹٤

مقدمه

بورخولدریا سپاسیه یک باسیل گرم منفی با ابعاد ۳/۲×۱/٦ میکرومتر است. این باکتری، اولین بار در سال ۱۹٤۹ توسط والتر بورخولدر (Walter Bulkholder) در دانشگاه کورنل به عنوان عامل پوسیدگی باکتریایی ریشه پیاز کشف شد(۱). بورخولدریا سپاسیه، یک باکتری غیر تخمیری، هوازی و شیمیوارگانوتروف (Chemoorganotroph)، با رشد بهینه در دمای ۳۵–۳۰ °C می‌باشد. این باکتری در اوایل قرن

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، سنندج، ایران
۲ دانشیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز و عضو مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳ استاد بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

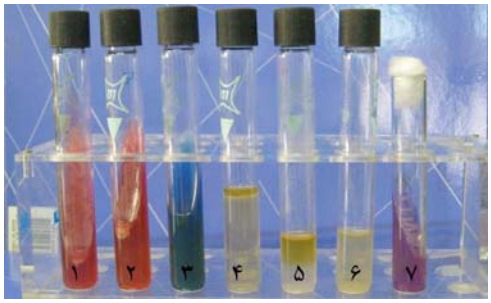
هفدهم، به عنوان یک عامل بیماریزای انسانی، و همچنین عامل برخی از بیماری‌های تنفسی و عفونت‌های لوله‌های ادراری و عامل تشدید کننده عفونت در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی، گرانولوماتوز مزمن و سیستیک فیبروزیس مطرح شد. در قرن هجدهم، نیز باکتری مزبور به عنوان عاملی برای تهدید زندگی در بیماران سیستیک فیبروزیس معرفی گردید که منجر به بروز مرگ و میر در حدود ۸۰٪ در این بیماران می‌شد(۳و۲). این باکتری قادر به رشد در اکثر محیط‌های مرطوب مانند خاک، آب، محیط‌های بیمارستانی، و محلول‌های ضد عفونی کننده می‌باشد.

بیماری سیستیک فیبروزیس، یک اختلال منوژنیک است که به صورت چند سیستمی تظاهر پیدا می‌کند(٤). بطور معمول، نخستین علائم و نشانه ها در دوران کودکی ظاهر می شوند، اما در ۵٪ موارد نیز در دوران بزرگسالی تظاهر می‌یابند(٦و۵). این بیماری با عفونت مزمن باکتریال مجاری هوایی مشخص می‌شود که منجر به برونشکتازی، نارسایی بخش درون ریز پانکراس و اختلال کارکرد روده‌ای، فعایت غیر طبیعی غدد عرق، و اختلال کارکرد ادراری-تناسلی می‌شود(۸و۷). در سال ۱۹۹۹ Henry و همکاران، محیط‌های کشت بورخولدریا سپاسیه را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه حاکی از آن بود که محیط(BCSA یا Burkholderia cepacia selective agar) بر سایر محیط‌ها از نظر رشد این باکتری و مهار رشد سایر باکتری‌های دستگاه تنفس ارجحیت دارد(۹). لذا، این مطالعه با هدف شناسایی و تعیین فراوانی بورخولدریا سپاسیه با روش کشت در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری انجام شد.

روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی و در طی ۸ ماه در سال ۱۳۹۱، ۱۰۰ نمونه ترشحات ریوی از مراجعین به بیمارستان مسیح دانشوری که غالباً کودکان زیر ۲ سال و مبتلا به سیستیک فیبروزیس بودند، جمع آوری شد. در تمام مراحل از سوش استاندارد ATCC 25416 بورخولدریا سپاسیه خریداری شده از شرکت ویژن پارس جهت کنترل مثبت استفاده گردید.

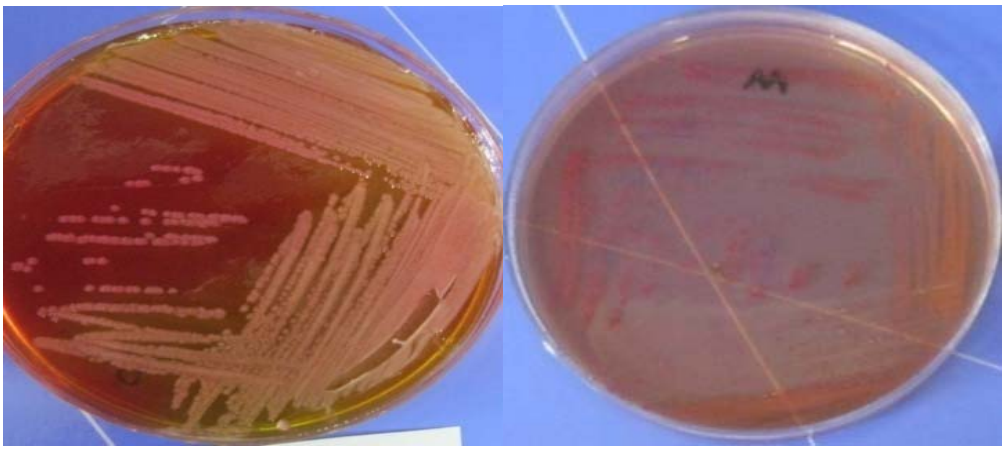
پس از دریافت هر نمونه از مراجعین به بیمارستان مسیح دانشوری با هدف احیای مجدد باکتری‌های موجود در آن، نمونه‌ها در محیط براث (BHI یا Brain Heart Infusion Broth) کشت داده شدند و پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون، توسط لوپ استریل، یک سوآپ از سوسپانسیون میکروبی حاصل روی محیط افتراقی مک کانکی آگار و محیط اختصاصی بورخولدریا سپاسیا آگار یا BCSA کشت و به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شد. در ادامه، پس از انکوباسیون، بررسی فنوتیپی و انجام آزمون‌های تشخیص اولیه، شامل رنگ آمیزی گرم و تست اکسیداز انجام گردید. در این دو آزمون، باکتری ها به شکل باسیل و کوکوباسیل گرم منفی که تست اکسیداز آنها مثبت بود، جهت انجام آزمون‌های افتراقی انتخاب شدند. این آزمون‌ها شامل کشت در محیط TSI آگار، کلیگلر(KIA)، محیط سیمون سیترات، تست حرکت، اندول، تست متیل رد(MR) و ووژس پروسکوئر (VP)، آزمون‌های اکسیداسیون- تخمیر(OF)، دکربوکسیلاسیون آرژینین، اورنیتین، لایزین و مقاومت به پلی میکسین بود(۹و۳). با توجه به آماده بودن این محیط‌ها به صورت پودرهای تجاری(تهیه شده از شرکت Merck)، از روز قبل طبق دستور العمل سازنده تهیه شد(شکل ۱).



شکل۱: آزمون‌های افتراقی جهت جداسازی بورخولدریا سپاسیه

یافته‌ها

با استفاده از محیط کشت اختصاصی BCSA، از ۱۰۰ نمونه ترشحات مورد بررسی، ۵ ایزوله به عنوان بورخولدریا سپاسیه با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید، اما هیچ نمونه مثبتی توسط محیط کشت افتراقی مک کانکی آگار بدست نیامد.



شکل ۲: کلنی بورخولدریا سپاسیه در محیط BCSA(سمت راست) و در محیط مک کانکی آگار(سمت چپ)

ویژگی کلنی‌های بورخولدریا سپاسیه پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون در این محیط مطابق شکل ۲، کلنی‌های محدب درشت با حاشیه مضرسی، کرم تا خاکستری رنگ است. اگرچه رشد این باکتری روی محیط غیر اختصاصی مک کانکی آگار بر خلاف محیط اختصاصی BCSA، بسیار کند رشد و همچنین سخت رشد بوده و نیاز به ۷۲ –٤٨ ساعت انکوباسیون دارد. ویژگی کلنی‌ها در محیط مک کانکی آگار مطابق شکل ۲، بسیار ریز سوزنی با حاشیه چین خورده و خشک می‌باشد.

جدول ۱: آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته روی سوش استاندارد کمپلکس بورخولدریا سپاسیه

Differential Biochemical tests	Color Gram	Pigment	Oxidase	Motility	Indole	TSI	H_2S in KIA	Citrate	Lysine	Arginine	Ornithine	Of Lactose	Of Maltose	Of Mannitol	DNAase	Polymixine
B.cepacia	Rod g-	-	+	+	-	ALK/ALK	-	w-	+	-	+	+	+	+	-	R

بحث

عفونت بورخولدریا سپاسیه در بیماران سیستیک فیبروزیس، همانند سودوموناس آئروژینوزا بوده و شامل کلونیزاسیون بدون علامت همراه با افزایش یکنواخت پاسخ ایمنی هومورال است که در فواصلی با اپی زودهایی از بیماری حاد ریوی همراه است. هرچند برخلاف سودوموناس آئروژینوزا، بورخولدریا سپاسیه اغلب به صورت موقت در بیماران کلونیزه شده و هیچگاه به فراوانی ۸۰ درصدی سودوموناس آئروژینوزا نمی‌رسند. به طور میانگین حدود ۲۰ درصد از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس با بورخولدریا سپاسیه کلونیزه شده‌اند(۱۰و۲).

پیچیدگی تاکسونومیک ارگانیسم‌های شبه بورخولدریا سپاسیه و فقدان یک روش فراگیر و مورد اجماع برای شناسایی سریع و دقیق این ارگانیسم‌ها، سبب شده است تا مطالعه بر روی بسیاری از جنبه‌های مفید این باکتری‌ها و همچنین شناسایی اهمیت سویه‌های مختلف این مجموعه با مشکل روبرو شود(۳).

در سال ۱۹۹٦ هنری و همکاران اولین بار فرمول محیط کشت انتخابی BCSA را طراحی کردند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که این محیط خاصیت مهارکنندگی بیشتری برروی باکتری‌های غیرمجموعه بورخولدریا سپاسیه دارد و سرعت رشد این باکتری روی این محیط به مراتب بیشتر از محیط‌هایی همچون (OFPBL Oxidation-Fermentation Polymyxin-Bacitracin- Lactose) یا و(PCA یا Pseudomonas Cepacia Agar) است(۹). در مطالعه حاضر هر ۵ سویه جدا شده توسط محیط کشت انتخابی BCSA جدا شد و از محیط کشت افتراقی مک کانکی آگار علیرغم مشاهده کلنی‌های ریز لاکتوز منفی، بور خولدریا سپاسیه شناسایی نگردید. در سال ۲۰۰۱ Wright و همکاران، ۱۱۳ بیمار مبتلا به سیستیک فیبروزیس را با استفاده از محیط کشت انتخابی BCSA مورد مطالعه قرار دادند که در مجموع ۵۳ مورد(۳۵/٦٪) از نظر بورخولدریا سپاسیه مثبت شدند(۱۱). برخلاف نتایج پژوهش Wright و همکاران میزان جداسازی از نمونه‌های مطالعه حاضر بسیار کمتر و تنها ۵٪ بود.

جداسازی کمپلکس بورخولدریا سپاسیه از بیماران سیستیک فیبروزیس توسط ارم و همکاران در سال ۲۰۰٤ صورت گرفت. آنها به عنوان جداسازی اولیه، نمونه‌های بورخولدریا سپاسیه را در محیط انتخابی BCSA کشت دادند و برای تشخیص از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده کردند. از ۵۳ نمونه تنفسی، ۵ نمونه بورخولدریا سپاسیه توسط آزمون‌های مزبور مورد تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که BCSA می‌تواند به عنوان محیط

انتخابی با ویژگی‌های بالا برای جداسازی اولیه و شناسایی باکتری کمپلکس بورخولدریا سپاسیه استفاده شود(۱۲)، که نتایج آن با یافته‌های ما همخوانی دارد.

فروزش فرد و همکاران در سال ۲۰۱۰-۲۰۰۹ تعداد ۲۷ نمونه خلط توسط سوآب از حلق بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس در بیمارستان الزهرای اصفهان را مورد بررسی قرار دادند. از ۷ نمونه(۲۶٪) باکتری پسودوموناس آئروژینوزا جدا گردید، اما بورخولدریا سپاسیه جداسازی نشد(۱۳). مقایسه یافته‌های ما با نتایج فروزش فرد و همکاران تفاوت قابل توجهی را نشان داد، زیرا علاوه بر جداسازی باکتری پسودوموناس به میزان ٤٠٪، بورخولدریا سپاسیه هم به میزان ۵٪ جدا گردید(١٤).

خان بابایی و همکاران در طی سال‌های ۲۰۰٤ تا ۲۰۰۹ تنوع میکروبی خلط بیماران سیستیک فیبروزیس را مورد بررسی قرار دادند. آنها ۱۲۹ نمونه خلط بیماران سیستیک فیبروزیس بیمارستان کودکان مفید تهران را جمع آوری کردند. در این مطالعه باکتری بورخولدریا در خلط بیماران سیستیک فیبروزیس جدا نگردید(۱۵)، که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد.

در مطالعه Da Silva Filho و همکاران تعداد ۱۰٦ نمونه خلط و ترشحات حلقی بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده حاکی از آلودگی ۵٦٪ نمونه‌ها به پسودوموناس آئروژینوزا، ٤/۳٪ به کمپلکس بورخولدریا سپاسیه، و ۲/۷٪ به استنوترفورموناس بود(١٦). یافته‌های مطالعه حاضر نتایج بدست آمده از مطالعه Da Silva Filho در خصوص جداسازی سودوموناس آئروژینوزا و کمپلکس بورخولدریا سپاسیه از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مشابهت دارد(١٦).

نتیجه گیری

در حال حاضر در کشور تشخیص بورخولدریا سپاسیه با تکیه بر روش‌های روتین کشت در محیط‌های غیر اختصاصی و تشخیص فنوتیپی صورت می‌گیرد. صرفنظر از زمان زیادی که صرف انجام این روش‌ها می‌شود، خطاهای فردی و تکنیکی در تشخیص وجود دارد که خود می‌تواند بر پیچیدگی درمان، افزایش مدت بستری فرد بیمار و انتقال باکتری از فردی به فرد دیگر بیفزاید. نتایج بدست آمده نشان داد که از ۱۰۰ نمونه ترشح ریوی بیماران سیستیک فیبروزیس، ۵ بورخولدریا سپاسیه به روش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی با استفاده از محیط اختصاصی BCSA شناسایی شد. اگرچه به دلیل پیچیدگی تاکسونومیک و شناسایی نادرست این ارگانیسم، استفاده از تکنیک مولکولی PCR به عنوان روش دقیق‌تر برای شناسایی این باکتری پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۱۹٦٦ مورخ ۳/ ۱۳۹۰/۵ می‌باشد. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌های طرح را تقبل نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین بدینوسیله از زحمات پرسنل بیمارستان ریوی مسیح دانشوری جهت همکاری در نمونه برداری تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology 1950; 40(1): 115-7.

2. Lyczak JB, Cannon CL & Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 194-222.

3. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. Microbiology 2007; 153(4): 917-23.

4. St Denis M, Ramotar K, Vandemheen K, Tullis E, Ferris W, Chan F, et al. Infection with Burkholderia cepacia complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. Chest 2007; 131(4): 1188-96.

5. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. Pediatric Respiratory Reviews 2004; 5(1): 367-9.

6. Starner TD, McCray PB Jr, American College of Physicians & American Physiological Society. Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: A window of opportunity to eradicate bacteria. Annals of Internal Medicine 2005; 143(11): 816-22.

7. Bethesda MD. Cystic fibrosis foundation registry data annual report. Cystic fibrosis foundation national cystic fibrosis patient registry 2001. Annual data report. Available at: https:// www.cff.org/Our-Research/CF-Patient-Registry/. 2002.

8. Schaedel C, de Monestrol I, Hjelte L, Johannesson M, Kornfalt R, Lindblad A, et al. Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. Pediatric Pulmonology 2002; 33(6): 483-91.

9. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ & Speert DP. Identification of Burkholderia cepacia isolates from patient with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. Journal of Clinical Microbiology 1997; 35(3): 614-9.

10. Martina P, Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, et al. Genetic diversity of Burkholderia contaminans isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. Journal of Clinical Microbiology 2013; 51(1): 339-44.

11. Wright RM, Moore JE, Shaw A, Dunbar K, Dodd M, Webb K, et al. Improved cultural detection of Burkholderia cepacia from sputum in patients with cystic fibrosis. Journal of Clinical Pathology 2001; 54(10): 803-5.

12. Eram SM, Behzadiannejad GH, Khatami GHR & Nafissi N. Detection of Burkholderia cepacia complex in patients with cystic fibrosis. Tanaffos Respiration Journal 2004; 3(9): 47-52[Article in Persian].

13. Forozeshfard M, Irajian G, Moslehi Takantape Z, Fazeli H, Salehi M & Rezania S. Drug resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cystic fibrosis patients at Isfahan AL Zahra hospital, Iran(2009-2010). Iranian Journal of Microbiology 2012; 4(2): 94-7.

14. Soltan Dallal MM, Rahbar M, Douraghi M, Rahimi Forushani A, Khan Babaei GH, Mobarhan M, et al. Isolation of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients and assessment of colony morphology and antibiotic susceptibility of isolates. Medical Laboratory Journal 2014; 8(5): 57-63.

15. Khanbabaei Q, Akbarizadeh MR, Tabatabaei SA & Fahimzad A. Microbial evaluation of sputum of cystic fibrosis patients. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 2012; 14(4): 15-8.

16. Da Silva Filho LV, Levi JE, Oda Bento CN, da Silva Ramos SR & Rozov T. PCR identification of Pseudomonas aeruginosa and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. Journal of Medical Microbiology 1999; 48(4): 357-61.

Isolation And Identification Of Burkholderia Cepacia From Respiratory Secretions In Cyctic Fibrosis Patients

Telefian Celin[1] (MSc.) - Kalantar Enayatolah[2] (Ph.D)
Soltan Dallal Mohammad Mehdi[3] (Ph.D)

1 Master of Sciences in Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research of Kurdistan Branch, Sanandaj, Iran
2 Associate Professor, Microbiology and Immunology Department, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Professor, Microbiology Section, Pathobiology Department, School of Public Health, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : May 2015
Accepted : Aug 2015

Background and Aim: Cystic fibrosis is a common hereditary and autosomal disorder. One of the factors in cystic fibrosis is Burkholderia cepacia which can be transmitted through the sharing of admitted patients with hospitalized patients. Purpose of this study, was isolation and identification of Burkholderia cepacia from respiratory secretions from Masih Daneshvari Hospital cystic fibrosis patient.

Materials and Methods: In this study, during 8 months from 2011 till 2012, 100 cases of pulmonary secretions were collected in Masih Daneshvari hospital patients. The specimens were cultured on both MacConkey agar and Burkholderia cepacia selective agar (BCSA) medium. After an incubation of 48 hours at 35°C, suspected colonies were isolated and by using of phenotypic and biochemical tests like TSI agar, simmons citrate medium, indol and motility, MR-VP, oxidation - fermentation (OF), arginine- ornithine - lysine decarboxylase test, Dnase test, and polymyxin resistance were identified.

Results: Using BCSA medium and biochemical tests led to isolation and identification of five Burkholderia cepacia strains from 100 respiratory samples. However, using Mac Conkey no Burkholderia cepacia was detected.

Conclusion: Our results clearly indicate the use of BCSA medium as a specific medium for isolation of Burkholderia cepacia in cystic fibrosis patients. So, presence of 5% Burkholderia cepacia in cystic fibrosis infections suggests detecting this bacterium, in a specific and sensitive culture medium.

Key words: Burkholderia Cepacia, Cystic Fibrosis, Respiratory Secretions

*** Corresponding Author:**
Soltan Dallal MM;
E -mail:
Soltanda@sina.tums.ac.ir