ارزیابی روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی در تشخیص جدایه‌های ادراری کمپلکس انتروباکتر کلوآکه

مجید اکبری (M.Sc)، بی‌تا بخشی*(Ph.D)، شهین نجارپیرایه (Ph.D)
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی

چکیده

سابقه و هدف: انتروباکترها متعلق به خانواده انتروباکتریاسه‌اند که دارای مشخصات متنوعی از نظر فنوتیپ و ژنوتیپ هستند. در مورد انتروباکترکلوآکه، شش گونه مشابه از نظر فنوتیپیک و ژنوتیپیک در یک کمپلکس به عنوان کمپلکس انتروباکترکلوآکه گنجانده شده‌اند و جدایه‌های وابسته آن جزء بیش‌ترین جدایه‌های عامل ایجاد عفونت‌های فرصت‌طلب سخت در بیمارستان می‌باشند. بر اساس توالی ژن hsp60 در این کمپلکس ۱۳ خوشه ژنتیکی تعریف کرده‌اند. چون در ایران هیچ‌گونه مطالعه‌ای بر روی این کمپلکس صورت نگرفته، در این پژوهش به ارزیابی روش‌های تشخیصی این باکتری‌ها در بین جدایه‌های ادراری با دو روش فنوتیپیک (کیت تجاری در دسترس) و ژنتیکی اقدام نمودیم.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۷۴ جدایه ادراری انتروباکترکلوآکه از ۶ بیمارستان شهر تهران جمع‌آوری گردید. جدایه‌ها با استفاده از کیت API20E به عنوان روش مرجع مجدداً تعیین هویت و جهت تایید نهایی هویت جدایه‌ها از تعیین توالی ناحیه ژنی hsp60 استفاده گردید.

یافته‌ها: کیت API 20E در مقایسه با تعیین توالی hsp60، به عنوان روش استاندارد طلایی از حساسیت ۸۸٪ و ویژگی ۶۰٪ جهت تعیین گونه‌ها، زیرگونه‌ها و ژنوتیپ‌های موجود در کمپلکس انتروباکترکلوآکه برخوردار می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بنا به اهمیت کمپلکس انتروباکترکلوآکه و نقش ویژه آن‌ها در عفونت‌های بیمارستانی و فرصت‌طلب و با توجه به محدودیت پایگاه داده‌های کیت API20E در تشخیص اعضاء این کمپلکس می‌بایست از تست‌های تکمیلی و یا روش‌های ملکولی که از دقت و صحت بالاتری برخوردارند، استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: انتروباکترکلوآکه، حساسیت و ویژگی، انتشار عفونت، hsp60

مقدمه

انتروباکترها باکتری‌هایی هستند گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری متعلق به خانواده انتروباکتریاسه که به‌طور وسیع در طبیعت یافت می‌شوند. آن‌ها در محیط طبیعی ساپروفیت هستند چنانچه در خاک و فاضلاب‌ها یافت می‌شوند و نیز قسمتی از فلور نرمال دستگاه گوارش انسان محسوب می‌شوند. آن‌ها هم‌چنین دارای پروفایل متنوعی از نظر فنوتیپ و ژنوتیپ هستند [۱].

طبقه‌بندی جنس انتروباکتر مکرر دچار تغییر شده است [۲]. چندین گونه در این جنس دوباره تعریف شده‌اند (انتروباکتر آئروژنز، انتروباکتر آمنیجنوس، انتروباکتر کانسروجنوس، انتروباکتر کووانی، انتروباکتر جرجوویا،

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۵۵۸-۰۲۱
Email: b.bakhshi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۳۰

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

انتروباکتر اینترمدیوس، انتروباکتر پیرینوس) به عنوان یک کمپلکس ژنتیکی است و مثال دیگر را می‌توان کمپلکس انتروباکتر کلوآکه ذکر کرد که گونه‌های دیگری در آن شناسایی شده‌اند [۳]. در مورد انتروباکتر کلوآکه، شش گونه مشابه از نظر فنوتیپیک و ژنوتیپیک در یک کمپلکس به عنوان کمپلکس انتروباکترکلوآکه گنجانده شده‌اند که این‌ها شامل: انتروباکتر کلوآکه، انتروباکتر آسبوریه، انتروباکتردیسولوند، انتروباکترهورمشه‌ای، انتروباکتر کوبی، انتروباکترنیمیپرسورالیس می‌باشند [۱] (زیرا بیش‌تر آن‌ها با انتروباکترکلوآکه شباهت ژنتیکی در حدود ۶۵-۶۱٪ دارند) و نیز علاوه بر این‌ها حداقل شش خوشه ژنتیکی دیگر در این کمپلکس تعریف شده است [۴].

پس آن‌چه که ما در کلینیک بر مبنای خصوصیات بیوشیمیایی به عنوان انتروباکترکلوآکه تشخیص می‌دهیم در واقع کمپلکس بزرگی از ۱۳ گونه، زیرگونه و ژنوتایپ است. آن‌ها به عنوان انتروباکتر کلواکه در میان ۱۰ گونه شایع عوامل عفونت‌های کسب شده از بیمارستان در عفونت‌های زخم، ادرار، ذات‌الریه و سپتی سمی‌های ایجاد شده در بخش مراقبت‌های ویژه تشخیص داده می‌شوند (در بعضی گزارشات عامل بیش از ۵٪ سپتی سمی‌ها و ۴٪ عفونت‌های ادراری و ۱۰٪ از موارد عفونت پریتونیت) [۵،۳-۷]. به جز این ارتباط، اطلاعات کمی درباره ارتباطات فیلوژنیتیکی در میان گونه‌های مربوط به کمپلکس انتروباکتر کلواکه و شیوع بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها وجود دارد [۵].

هم‌چنین این باکتری‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مقاوم به لحاظ وجود مقاومت‌های متقاطع و تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، AmpC بتالاکتاماز و کارباپنومازها در بین جدایه‌های بیمارستانی می‌باشند پس آن‌ها یک خطر بالقوه به لحاظ انتقال این مقاومت‌ها و بالفعل به جهت عفونت‌های مقاوم به درمانی که ایجاد می‌کنند، هستند [۹،۸،۱].

انتروباکتر کلواکه یکی از شناخته شده‌ترین گونه‌های جنس انتروباکتر و به عنوان نماینده کمپلکس انتروباکتر کلوآکه در خیلی از نمونه‌های بالینی به عنوان پاتوژن یافت می‌شود که نشان‌دهنده این موضوع است که ما با جنس انتروباکتر و نیز این کمپلکس اغلب اوقات در نمونه‌های بالینی انسانی مواجه هستیم، اگر چه با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی مرسوم و کیت‌های بیوشیمیایی تجاری مثل API 20E این باکتری‌ها معمولاً به عنوان انتروباکتر کلوآکه شناسایی می‌شوند، اما تشخیص دقیق اعضاء این کمپلکس بسیار مشکل می‌باشد [۱۰].

روش‌های ملکولی در سال‌های اخیر به طور قابل توجهی به تشخیص جدایه‌های کمپلکس انتروباکتر کلوآکه کمک کرده است به طوری که هافمن و روگنکامپ بر اساس تجزیه و تحلیل توالی ژن hsp60 بر روی یک مجموعه از جدایه‌های جمع‌آوری شده از سراسر دنیا در این کمپلکس ۱۳ خوشه ژنتیکی تعریف کرده‌اند [۴]. خصوصیات ملکولی جدایه‌های بالینی نشان داده است که اغلب جدایه‌های کمپلکس انتروباکتر کلوآکه از نمونه‌های انسانی متعلق به خوشه ژنتیکی III انتروباکتر کلوآکه و خوشه‌های ژنتیکی VI و VIII یعنی زیر گونه‌های انتروباکتر هورمشه ایمی باشند [۱۱،۵،۴].

بنا به اهمیت روزافزون کلینیکی که در دنیا برای جدایه‌های این کمپلکس از نظر تشخیص نوع، میزان شیوع هر کدام از آن‌ها در نمونه‌های بالینی، ارتباط فیلوژنتیکی بین آن‌ها و درمان مناسب عفونت‌های ناشی از آن‌ها قائلند ما در این پژوهش به ارزیابی روش‌های تشخیصی این باکتری‌ها در بین جدایه‌های ادراری با دو روش فنوتیپیک معمول (کیت تجاری در دسترس) و مولکولار اقدام نمودیم.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های مورد بررسی. در این مطالعه توصیفی در فاصله زمانی یک سال، از دی ماه ۱۳۹۱ الی آذر ماه ۱۳۹۲، ۷۴ جدایه به عنوان انتروباکترکلوآکه از نمونه ادرار بیماران بستری در شش بیمارستان شهر تهران، ۵ بیمارستان دانشگاهی و ۱ بیمارستان غیر دانشگاهی، جداسازی، بر اساس تست‌های بیوشیمیایی روتین تعیین هویت و وارد مطالعه گردید. تمامی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

جدایه‌ها ارسالی ابتدا از نظر خلوص بر روی محیط کاسوآگار مجدداً کشت و جداسازی شدند.

شناسایی باکتری‌ها . سپس از کلنی‌های مجزا با توجه به دستورالعمل کیت API 20E (BioMerieux, France) با سرم فیزیولوژی مخلوطی از باکتری با کدورت حدود ۰/۵ مک‌فارلند ایجاد و به ویال‌های کیت تلقیح گردید و در گرم‌خانه ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند و نیز در کنار آن آزمایش‌های اکسیداز، مشاهده حرکت به کمک لام مرطوب، O/F گلوکز و رشد بر روی محیط مک کانکی آگار انجام گردید، پس از آن بنا به دستورالعمل کارخانه و با کمک نرم‌افزار APIwebTMstand alone V 1.2.1 آزمایش‌های ۲۷ گانه قرائت گردید و در نهایت نتایج ثبت گردید.

آماده سازی و تخلیص DNA . DNA باکتری‌ها جهت انجام آزمایش PCR به روش جوشاندن تهیه گردید، در این روش تکه‌هایی از چند کلنی مجزا شده از باکتری را در روی محیط کازوآگار، که یک شب گرم‌خانه‌گذاری را گذرانده‌اند، در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر با درجه (grade) ملکولی استریل در میکروتیوب ۱/۵میلی‌لیتر استریل حل نموده، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آب جوش قرار داده و پس از آن با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند. در نهایت از مایع رویی ۲۰۰–۱۰۰ میکرولیتر برداشته شده و در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتر در ۲۰– فریز و نگه‌داری می‌شود. در زمان نیاز با فریز کردن آن روی یخ DNA استخراجی آماده استفاده می‌باشد.

انجام PCR و تعیین توالی جدایه‌ها. تعیین توالی قسمتی از ژن hsp60، یکی از پروتئین‌های شوک حرارتی، به روش توصیف شده هافمن و روگنکامپ (۲۰۰۳) انجام شد [۴]. در این روش از پرایمرهای Hsp60-F (5_-GGT AGA AGA AGG CGT GGT TGC-3) و Hsp60-R (5_-ATG CAT TCG GTG GTG ATC ATC AG-3) جهت تکثیر ژنتیکی یک قطعه ۳۴۱ bp از ژنhsp ۶۰ مورد استفاده قرار گرفت [۴].

تکثیر در یک مخلوط واکنش با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد، که شامل ۱۵/۶ میکرولیترآب مقطر با درجه (grade)ملکولی، ۲/۵ میکرولیتر بافر تک پلیمراز X ۱۰، ($10\ mM\ l^{-1}$) ۰/۳ dNTPs میکرو لیتر، ۰/۵U تگ DNAپلیمراز، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۶ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰mM) وDNA الگو ۵ میکرولیتر بود. در میکروتیوب کنترل منفی همه ترکیبات گفته شده وجود داشت به جزء DNA الگو که به جای آن آب مقطر اضافه گردید.

پروتکل PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۴°C برای ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل ش امل انکوباسیون در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، (annealing) ۵۷°C برای ۳۰ ثانیه (که این دما برای هر کدام از پرایمرها به طور مجزا محاسبه و آزمایش شده بود)، و مرحله توسعه (extension) ۷۲°C برای ۶۰ ثانیه، که نهایتاً با یک مرحله توسعه نهایی ۷۵°C برای ۵ دقیقه به پایان می‌رسید. آشکارسازی محصول PCR با الکتروفورز ۲ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱٪ و رنگ‌آمیزی با رنگ Safe Stain انجام گرفت. واکنش PCR در یک دستگاه Bio-Rad MJ Mini Gradient Thermal Cycler انجام شد. رشته پیشرو قطعه DNA تکثیر شده به وسیله شرکت ژن فن آوران تعیین توالی شد.

در این پژوهش همه جدایه‌هایی که با کیت API 20E به عنوان انتروباکتر کلواکه شناسایی شده بودند حداقل پروفایل API مورد قبول به عنوان انتروباکتر کلوآکه عبارت از ۳، ۳۰۵، ۵۷۳، ۵۷ با سطح قابل قبول Good Identification و با ۹۵٪ شباهت با انتروباکتر کلوآکه بود. تمامی جدایه‌ها مورد آزمایش PCR قرار گرفتند و سپس محصول آن تعیین توالی گردید و پس از آن نتایج با توالی‌های رفرانس و ثبت شده در بانک ژن که توسط سایر پژوهشگران مانند هافمن و روگنکامپ مورد استفاده قرار گرفته بودند مورد مقایسه قرارگرفتند [۴]. برای بررسی هم‌ترازی (alignment) توالی‌های به دست آمده ابتدا از نرم‌افزار BLAST سایت NCBI استفاده گردید تا هم‌ترازی با کلیه توالی‌های ثبت شده انجام شود سپس با استفاده از نرم‌افزار آنلاین CLUSTALW2

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) مقایسه هم‌ترازی با جدایه‌های دانلود شده از بانک ژن انجام و نتایج ثبت گردید. جدایه‌های رفرانس و ثبت شده مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب عبارتند از E. asburiae (AJ567893/1)، E. kobei (AJ567888/1)، E. cloacae III (AJ567880/1)، E. cloacae IV (AJ543893/1)، E. ludwigii (AJ862859/1)، E. hormaechei subsp. Oharae (AJ567891/1)، E. hormaechei subsp. Hormaeche (AJ866491/1)، E. hormaechei subsp. Steigerwaltii (AJ567892/1)، E. cloacae IX (AJ543878/1)، E. nimipressuralis (AJ567900/1)، E. cloacae subsp. Cloacae (AJ543855.1/)، E. cloacae subsp. Dissolvens (AJ417143/1)، E. cloacae sequence crowd (AJ543872/1) و در نهایت نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

از ۷۴ جدایه ادراری که در ۶ بیمارستان بزرگ شهر تهران به عنوان انتروباکتر کلوآکه گزارش شده بودند بعد از آزمایش با کیت تشخیصی API 20E شاخص‌ترین جدایه‌ها ۴۸ انتروباکتر کلوآکه (۶۴/۸۶٪)، ۱۱ انتروباکتر آئروژنوزا (۱۴/۸۶٪) و ۹ انتروباکتر (کورونوباکتر) ساکازاکی (۱۲/۱۶٪) شناسایی شدند. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. جدایه های ادراری تعیین هویت شده با کیت API 20E

جدایه باکتری	تعداد
کمپلکس انتروباکتر کلواکه	۴۸
انتروباکتر آئروژنوز	۱۱
انتروباکتر ساکازاکی	۹
سراشیا ادوری فرا	۳
سراشیا فیکاریا	۱
گونه روآلتلا	۱
گونه پانتوآ	۱
جمع کل	۷۴

نتایج PCR از نظر وجود ژن hsp60 و تعیین توالی محصولات به دست آمده از ۴۸ جدایه انتروباکتر کلوآکه و نیز نتایج به دست آمده از 7 PCR جدایه انتروباکتر ساکازاکی، ۳ جدایه انتروباکتر آئروژنوز و ۲ جدایه سراشیا ادوری فرا در جدول ۲ خلاصه شده است.

از کل ۷۴ ایزوله‌ای که به‌طور اولیه به عنوان انتروباکتر کلوآکه در آزمایشگاه‌های تشخیصی۶ بیمارستان بزرگ در تهران شناسایی شده بودند، ۶۴/۸٪ (۴۸ جدایه) به وسیله کیت API 20E به عنوان کمپلکس انتروباکتر کلوآکه شناسایی شدند (جدول ۱) که در ادامه ۷ سویه انتروباکتر ساکازاکی، ۳ سویه انتروباکتر آئروژنز و ۲ سویه سراشیا ادوری فرا به صورت تصادفی انتخاب و به همراه جدایه‌های کمپلکس انتروباکتر کلوآکه تعیین توالی شدند که در نتیجه به کمک روش‌های ملکولی از ۶۰ جدایه تعیین توالی شده، ۸۳/۳٪ (۵۰ جدایه) به عنوان کمپلکس انتروباکتر کلوآکه شناسایی شدند (جدول ۲).

آنالیز آماری. بر اساس شیوه‌های ارزیابی آزمون‌ها و ابزارهای تشخیصی، قابلیت اعتماد (Validity) یا اعتبار یک آزمون، بیان‌کننده توانایی آن در تشخیص و جدا کردن موارد مثبت از غیر آن است و صحت (Accuracy) یا درستی آزمون به درجه نزدیک بودن مقدار اندازه‌گیری شده به مقدار واقعی و یا درجه انطباق نتایج با واقعیت، اطلاق می‌شود. قابلیت اعتماد دارای دو جزء حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) است و لازم است هر دو جزء به هنگام سنجش صحت یک آزمون در نظر گرفته شود که اجزاء مورد اشاره را به صورت نسبت، بیان می‌کنیم [۱۲].

حساسیت به معنی نسبتی از موارد مثبت است که آزمایش آن‌ها را به درستی به عنوان مثبت علامت‌گذاری می‌کند. ویژگی به معنی نسبتی از موارد منفی است که آزمایش آن‌ها را به درستی به عنوان منفی علامت‌گذاری می‌کند. به بیان ریاضی، حساسیت حاصل تقسیم موارد مثبت واقعی به حاصل جمع موارد مثبت واقعی و موارد منفی کاذب است. ویژگی حاصل تقسیم موارد منفی واقعی به حاصل جمع موارد منفی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

واقعی و مثبت کاذب است و نیز ارزش اخباری، بازتاب توان تشخیصی آزمون است [۱۲].

حساسیت = مثبت واقعی / (مثبت واقعی + منفی کاذب)

ویژگی = منفی واقعی / (منفی واقعی + مثبت کاذب)

ارزش اخباری مثبت = مثبت واقعی / (مثبت واقعی + مثبت کاذب)

ارزش اخباری منفی = منفی واقعی / (منفی واقعی + منفی کاذب)

با توجه به تعاریف فوق کیت API 20E در مقایسه با روش ملکولی (تعیین توالی hsp60)، به عنوان روش استاندارد طلایی جهت تعیین گونه‌ها، زیر گونه‌ها و ژنوتیپ‌های موجود در کمپلکس انتروباکتر کلوآکه، دارای حساسیت ۸۸٪ و ویژگی ۶۰٪ و ارزش اخباری مثبت ۹۱/۶٪ و ارزش اخباری منفی ۵۰٪ در تشخیص کمپلکس انتروباکتر کلوآکه می‌باشد.

جدول ۲. :نتایج حاصل از PCR و تعیین توالی جدایه های به دست آمده از آزمایش با کیت API 20E

جدایه بر اساس API 20E	تعداد	جدایه براساس تعیین توالی	تعداد	نتایج
کمپلکس انتروباکتر کلوآکه	۴۸	*کمپلکس انتروباکتر کلوآکه*	۴۴	مثبت واقعی
		انتروباکتر آئروژنوزا	۱	مثبت کاذب
		اشرشیا کلی	۱	مثبت کاذب
		شیگلا بوئیدی	۱	مثبت کاذب
		گونه پروتئوس	۱	مثبت کاذب
انتروباکتر ساکازاکی	۷	*کمپلکس انتروباکتر کلوآکه*	۵	منفی کاذب
		سیتروباکتر کوزری	۲	منفی واقعی
انتروباکتر آئروژنوزا	۳	*کمپلکس انتروباکتر کلوآکه*	۱	منفی کاذب
		انتروباکتر آئرونوزا	۲	منفی واقعی
سراشیا ادوری فرا	۲	*اشرشیا کلی*	۱	منفی واقعی
		سیتروباکتر کوزری	۱	منفی واقعی
جمع کل	۶۰	جمع کل	۶۰	

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات انجام شده توسط اوهارا و هافمن؛ سیستم‌های تجارتی مورد استفاده برای تشخیص خانواده انتروباکتریاسه مثل API 20E و Vitek2 تنها قادر به تمایز انتروباکتر کلوآکه و انتروباکتر آسبوریه از کمپلکس انتروباکتر کلوآکه می‌باشند و برای جداسازی بقیه اعضاء این کمپلکس نیاز به استفاده از تست‌های تکمیلی دیگر و یا کیت‌های تجاری دیگری می‌باشد [۱]. بر همین اساس که نشان‌دهنده پایین بودن حساسیت و ویژگی این کیت‌ها در جداسازی اعضاء این کمپلکس از نمونه‌های بالینی و نیز مخفی ماندن بیماری‌زاهای اصلی این کمپلکس از دید محققین و بررسی‌های هدفمند بر روی آن‌ها در کشورهای در حال توسعه مثل ایران شده است.

در ارزیابی‌های انجام شده توسط محققین مختلف بر روی کیت API 20E و مقایسه آن با روش‌های فنوتیپیک دستی و تجاری دیگر در نمای کلی تشخیص خانواده انتروباکتریاسه، کیت API 20E از عملکرد خوبی برخوردار بوده است به طور مثال در پژوهش انجام شده توسط Nucera و همکاران (۲۰۰۶) کیت API 20E و PCR ژن invA برای تشخیص گونه‌های سالمونلا در مقایسه با تعیین توالی ژن SrRNA۱۶ حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۶٪ به دست آوردند [۱۳]. اعلی عبدالکدهیم جواد و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای که بر روی ۴۸۰ نمونه مدفوع از نظر گونه‌های سالمونلا انجام دادند حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۷۵٪ را برای کیت MiniAPI 20E

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

در مقایسه با روش ملکولی به دست آوردند [۱۴]. هم‌چنین Ohud و همکاران (۲۰۱۲) در ارزیابی روش‌های کشت، سرولوژی، کیت API 20E و روش‌های ملکولی برای شناسایی ۲۳ ایزوله سالمونلا جدا شده از نمونه‌های انسانی حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۶۶/۶٪ را برای کیت API 20E در مقایسه با روش‌های ملکولی به دست آوردند [۱۵] و نیز علیزاده و همکاران در مقایسه کیت API 20E با روش‌های ملکولی به این نتیجه رسیدند که حساسیت‌ای کیت برای سالمونلا انتریکا ۹۵٪ و برای گونه‌های شیگلا ۹۳/۷٪ می‌باشد [۱۶].

در مطالعه دیگر Croci و همکاران (۲۰۰۷) در یک مطالعه چند مرکزی بر روی ۶۰ سویه از ویبریو پاراهمولیتیکوس نشان دادند که API 20E دارای حساسیت ۵۳٪ و ویژگی ۹۵٪ در مقایسه با API 20NE و Alsina's Scheme و روش ملکولی می‌باشد [۱۷]. Warnken و همکاران (۲۰۱۲) در برزیل روش‌های بیوشیمیایی از جمله API 20E و ملکولی را برای تشخیص کورنوباکتر (انتروباکتر) ساکازاکی جدا شده از شیر خشک نوزادان مورد ارزیابی قرار دادند که API 20E از حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۷۱/۴٪ برخوردار بود [۱۸].

همان‌طور که مشاهده می‌شود نتایج به دست آمده از مقایسه کیت API 20E با روش‌های ملکولی بر پایه PCR عمدتاً نتایجی با حساسیت و ویژگی بالایی را در بر داشته است اما این به این مفهوم نیست که این کیت قابلیت شناسایی همه باسیل‌های گرام منفی روده‌ای را به‌طور یکسان دارد و حساسیت و ویژگی این کیت در همه موارد بالاست. بلکه مشکل تشخیص باکتری‌های کمپلکس هم‌چنان پا برجاست کما این‌که در مطالعه حاضر حساسیت ۸۸٪ و ویژگی ۶۰٪ داشت و حداکثر قادر به تفکیک ۲ گونه از ۶ گونه موجود در این کمپلکس و یا به بیان دیگر ۲ گونه از ۱۳ خوشه ژنتیکی این کمپلکس است.

در مجموع استفاده از کیت‌های تجارتی مثل کیت API 20E در مقایسه با روش‌های فنوتیپیک معمول در دسترس که شامل مجموعه‌ای از تست‌های رایج برای تعیین هویت باسیل‌های گرام منفی روده‌ای هستند، چون از نرم‌افزار ویژه برای دسترسی به پایگاه داده‌های خود بهره می‌برد و از اصل بیش‌ترین مشابهت پیروی می‌کنند، جواب‌های به‌دست آمده از آن‌ها از صحت و قابلیت اعتماد بیش‌تری برخوردارند که با توجه به محدودیت‌های تست‌های بیوشیمیایی روتین که عمدتاً منحصر به چند تست، الگوریتم‌هایی که دامنه تشخیص آن‌ها در بعضی موارد در حد جنس می‌باشد، نحوه قرائت واکنش‌های بیوشیمیایی که بسته به فرد، درصد مثبت و یا منفی آن را در نظر بگیرد و هم‌چنین در مواردی به روز نبودن جداول و الگوریتم‌ها، این کیت‌ها از تنوع تست بالایی برخوردارند و با استفاده از نرم‌افزار ویژه و دسترسی به پایگاه داده‌ها خطای انسانی را به حداقل رسانده‌اند.

اما از طرفی نیز محدودیت در پروفایل ایزوله‌های وارد شده در این پایگاه داده‌ها نقطه ضعف این سیستم‌های تشخیصی بوده و باعث عدم کارایی آن در شناسایی مجموعه‌های کمپلکس از باکتری‌ها می‌شود کما این‌که در مطالعات انجام شده توسط Vithanage و همکاران (۲۰۱۴) و leite و همکاران (۲۰۱۱) این موضوع در مورد سیستم‌های API (API 20E & API 20nE) مشخص شد که این کیت‌ها قادر به تفکیک اعضاء کمپلکس باکتری‌ها نیستند و صحت این تست‌ها در حد جنس، گونه و زیرگونه به ترتیب ۹۷/۳٪، ۶۰/۵٪ و ۱۰/۵٪ می‌باشد. که در این گونه موارد استفاده از الگوهای به‌دست آمده از سکانس ژن‌هایی خاص مثل hsp60 و۱۶SrRNA که جزء ژن‌های به اصطلاح house keeping هستند می‌تواند به این نقیصه کمک کند [۲۰،۱۹].

اما چون خیلی از آزمایشگاه‌های تشخیصی دارای امکانات تشخیص ملکولی نیستند بنابراین تمایل به استفاده از کیت‌های تجاری در این سطح را دارند، که از قیمت مناسب، وقت‌گیر نبودن و از حساسیت و ویژگی نسبتاً بالاتری نسبت به روش‌های بیوشیمیایی روتین برخوردارند و در مقایسه با روش‌های ملکولی نیز از مزیت قیمت تمام شده پایین‌تر، سادگی انجام و صحت نسبتاً مناسبی برخوردارند. علی‌رغم تمام مزیت‌های گفته شده هم‌چنان مشکل عدم شناسایی جدایه‌هایی که هنوز در تاکسونومی باکتری‌ها تعیین تکلیف

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

نشده‌اند و یا مجموعه‌های کمپلکس باکتری‌ها مثل کمپلکس انتروباکتر کلوآکه که در پایگاه داده‌های این کیت‌ها اطلاعات شان وارد نشده است هم‌چنان باقی خواهد ماند و در نتیجه در مراکزی که از این کیت‌ها استفاده می‌کنند بیماری‌زاهای مهم این کمپلکس‌ها از نظر دور می‌مانند. بنابراین با توجه به نتایج مطالعات فوق و با عنایت به حساسیت ۸۸٪ و ویژگی ۶۰٪، این کیت در شناسایی کمپلکس انتروباکتر کلوآکه نمی‌تواند ملاک تشخیص قطعی باشد و برای تکمیل روند تشخیص می‌بایست یا از تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی، که در همه آزمایشگاه‌ها در دسترس نیست و معمولاً هم وقت‌گیر بوده و هزینه‌های سربار ایجاد می‌کند، استفاده کرد که باز نسبت به روش‌های دقیق ملکولی از صحت و دقت پایین‌تری برخوردارند و یا از روش‌های تعیین هویت بر مبنای الگوهای تعیین شده بر مبنای ژن‌های به اصطلاح housekeeping مثل hsp60 (روش‌های ملکولی) بهره برد که با توجه به صحت و دقت بالای این تست‌ها به نظر استفاده از آن‌ها در مجموع برای تشخیص باکتری‌های کمپلکسی مثل انتروباکتر کلوآکه به صرفه و بیش‌تر قابل توصیه است.

منابع

[1] Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiol 2012; 7: 887-902.

[2] O'Hara CM, Steigerwalt AG, Hill BC, Farmer JJ, 3rd, Fanning GR, Brenner DJ. Enterobacter hormaechei, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. J Clin Microbiol 1989; 27: 2046-2049.

[3] Morand PC, Billoet A, Rottman M, Sivadon-Tardy V, Eyrolle L, Jeanne L, et al. Specific distribution within the Enterobacter cloacae complex of strains isolated from infected orthopedic implants. J Clin Microbiol 2009; 47: 2489-2495.

[4] Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenspecies Enterobacter cloacae. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 5306-5318.

[5] Kremer A, Hoffmann H. Prevalences of the Enterobacter cloacae complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 2951-2955.

[6] Sanders WE Jr, Sanders CC. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 220-241.

[7] Fernandez-Baca V, Ballesteros F, Hervas JA, Villalon P, Dominguez MA, Benedi VJ, Alberti S. Molecular epidemiological typing of Enterobacter cloacae isolates from a neonatal intensive care unit: three-year prospective study. J Hosp Infec 2001; 49: 173-182.

[8] Rahbar M, M.Sc. LA, Mohammad-Zadeh M, Alinejad F, Soleymanzadeh S, Sattarzadeh M, Lari AR. The prevalence of nosocomial infections caused by Enterobacter cloacae and antibiotic resistant patterns in samples isolated from patients in two hospitals in Tehran. Tehran Univ Med J 2012; 70: 183-187. (Persian).

[9] Hoffmann H, Stürenburg E, Heesemann J, Roggenkamp A. Prevalence of extended-spectrum β-lactamases in isolates of the Enterobacter cloacae complex from German hospitals. Clin Microbiol Infec 2006; 12: 322-330.

[10] Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 1998; 36: 3674-3679.

[11] Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-van Hall MA. Enterobacter cloacae outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. Emerg Infect Dis 2006; 12: 807-812.

[12] Hatami H. Assessment Methods of test and diagnostic tools. In: Hatami H, editor. Clinical applications of epidemiology. Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services: Company of Aydhprdazan fan o homar; 1388. p. 154-172.

[13] Nucera DM, Maddox CW, Hoien-Dalen P, Weigel RM. Comparison of API 20E and invA PCR for identification of Salmonella enterica isolates from swine production units. J Clin Microbiol 2006; 44: 3388-3390.

[14] Jawad AA-K, Al-Hamadani AH. Detection of fimA and fimC genes of Salmonella isolates by using Polymerase Chain Reaction. Journal of Basrah Researches ((Sciences)) Volume 2011; 37.

[15] Ohud M, Eman MH, Hayam SA. Detection of Salmonella strains in clinical samples from Saudi Arabia by invA and hilA polymerase chain reaction (PCR)-based assays. African J Microbiol Res 2012; 6: 5410-5416.

[16] Alizadeh-Hesar M, Bakhshi B, Najar-peerayeh S. Molecular diagnosis of salmonella enterica and shigella spp. in stool Sample of children with diarrhea in Tehran. Int J Enteric Pathog 2014; 2: e17002.

[17] Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L, Ottaviani D, Pruzzo C, et al. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of Vibrio parahaemolyticus. J Appl Microbiol 2007; 102: 229-237.

[18] Warnken MB, Brandão ML, Souza AE, Romão CM, Nogueira AC, Destro MT. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii). Rev Inst Adolfo Lutz 2012; 71: 21-31.

[19] Vithanage NR, Yeager TR, Jadhav SR, Palombo EA, Datta N. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. Int J Food Microbiol 2014; 189: 26-38.

[20] Leite FC, Pinheiro Machado AB, Lutz L, Vieira MI, Barth AL. Molecular identification of burkholderia cepacia complex and species distribution among cystic fibrosis patients seen at the reference center in southern Brazil. Clin Biomed Res 2011; 31: 138-144.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

Evaluation of biochemical and molecular techniques in the diagnosis of urinary isolates of Enterobacter cloacae

Majid Akbari (M.Sc), Bita Bakhshi (Ph.D)*, Shahin NajarPeerayeh (Ph.D)
Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 20 Sep 2014; Accepted: 19 Apr 2015)

Introduction: *Enterobacter* spp. belongs to the family of *Enterobacteriaceae* and has a variety of phenotypic and genotypic profiles. Within *Enterobacter cloacae* complex, six genetically related and phenotypically similar species have been merged and strains belonging to these species are encountered among the most common strains able to cause severe opportunistic infections in hospitalized patients. Sequence analyzing a segment of *hsp60* gene belong to this complex have demonstrated 13other genetic clusters. Since this complex is rarely identified in Iran, therefore, we aimed to evaluate the efficiency of phenotypic (commercial routine kit) and molecular methods for detecting this complex in urinary isolates.

Materials and Methods: In this study 74 *Enterobacter cloacae* urinary isolates, collected from 6 large hospitals in Tehran, were characterized by API20E kit and for final approval of diagnosis, *hsp60* gene sequencing was performed.

Results: Using API20E kit for detecting *Enterobacter cloacae* in comparison to *hsp60* sequencing, as gold standard for determining the species, sub-species and genotypes in *Enterobacter cloacae* complex, have demonstrated sensitivity and specialty about 88% and 60%, respectively in bacteria detection.

Discussion: Considering the importance and particular role of *Enterobacter cloacae* complex in causing hospital-acquired and opportunist infections and according to limited capability of API20E kit in providing precise analytic data, performance of complimentary tests or molecular methods, such as *hsp60* sequencing, with high accuracy and validity, are highly suggested.

Key world: Enterobacter cloacae, Chaperonin 60/genetics, Sensitivity and specificity, Cross Infection
.

* Corresponding author. Tel: +98 21 82884558
b.bakhshi@modares.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]