

## 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 انتروباکتر کلوآکه، شش گونه مشابه از نظر فنوتیپیک و ژنوتیپیک در یک کمپلکس به عنوان کمپلکس انتروباکتر کلوآکه 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 انتروباکتر کلوآکه 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 انتروباکتر کلوآکه برخوردار می‌باشد. نتیجه‌گیری: بنا به اهمیت کمپلکس انتروباکتر کلوآکه 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 مولکولی که از دقت و صحت بالاتری برخوردارند، استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: انتروباکتر کلوآکه، 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 آمینجنوس، انتروباکتر کانسروجنوس، انتروباکتر کووانی، انتروباکتر جرجویا،

خیلی از نمونه های بالینی به عنوان پاتوژن یافت می شود که نشان دهنده این موضوع است که ما با جنس انتروباکتر و نیز این کمپلکس اغلب اوقات در نمونه های بالینی انسانی مواجه هستیم، اگر چه با استفاده از آزمایش های بیوشیمیایی مرسوم و کیت های بیوشیمیایی تجاری مثل API 20E این باکتری ها معمولاً به عنوان انتروباکتر کلوآکه شناسایی می شوند، اما تشخیص دقیق اعضاء این کمپلکس بسیار مشکل می باشد [۱۰].

روش های ملکولی در سال های اخیر به طور قابل توجهی به تشخیص جدایه های 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 جدایه های جمع آوری شده از سراسر دنیا در این کمپلکس ۱۳ خوشه ژنتیکی تعریف کرده اند [۴]. خصوصیات ملکولی جدایه های بالینی نشان داده است که اغلب جدایه های کمپلکس انتروباکتر کلوآکه از نمونه های انسانی متعلق به خوشه ژنتیکی III انتروباکتر کلوآکه و خوشه های ژنتیکی VI و VIII یعنی زیر گونه های انتروباکتر هورمسه ایمی باشند [۵، ۴، ۱۱].

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

## مواد و روش ها

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

انتروباکتر اینترمدیوس، انتروباکتر پیرینوس) به عنوان یک کمپلکس ژنتیکی است و مثال دیگر را می توان کمپلکس انتروباکتر کلوآکه ذکر کرد که گونه های دیگری در آن شناسایی شده اند [۳]. در مورد انتروباکتر کلوآکه، شش گونه مشابه از نظر فنوتیپیک و ژنوتیپیک در یک کمپلکس به عنوان کمپلکس انتروباکتر کلوآکه گنجانده شده اند که این ها شامل: انتروباکتر کلوآکه، انتروباکتر آسبوریه، انتروباکتر دیسولوندا، انتروباکتر هورمسه ای، انتروباکتر کوبی، انتروباکتر نیمپیرسورالیس می باشند [۱] (زیرا بیش تر آنها با انتروباکتر کلوآکه شباهت ژنتیکی در حدود ۶۵-۶۱٪ دارند) و نیز علاوه بر این ها حداقل شش خوشه ژنتیکی دیگر در این کمپلکس تعریف شده است [۴].

پس آن چه که ما در کلینیک بر مبنای خصوصیات بیوشیمیایی به عنوان انتروباکتر کلوآکه تشخیص می دهیم در واقع کمپلکس بزرگی از ۱۳ گونه، زیرگونه و ژنوتایپ است. آنها به عنوان انتروباکتر کلوآکه در میان ۱۰ گونه شایع عوامل عفونت های کسب شده از بیمارستان در عفونت های زخم، ادرار، ذات الریه و سپتی سمی های ایجاد شده در بخش مراقبت های ویژه تشخیص داده می شوند (در بعضی گزارشات عامل بیش از ۵٪ سپتی سمی ها و ۴٪ عفونت های ادراری و ۱۰٪ از موارد عفونت پریتونیت) [۳، ۵-۷]. به جز این ارتباط، اطلاعات کمی درباره ارتباطات فیلوژنتیکی در میان گونه های مربوط به کمپلکس انتروباکتر کلوآکه و شیوع بیماری های ایجاد شده توسط آنها وجود دارد [۵].

همچنین این باکتری ها به عنوان یکی از مهم ترین باکتری های مقاوم به لحاظ وجود مقاومت های متقاطع و تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف، AmpC بتالاکتاماز و کاربامپنومازا در بین جدایه های بیمارستانی می باشند پس آنها یک خطر بالقوه به لحاظ انتقال این مقاومت ها و بالفعل به جهت عفونت های مقاوم به درمانی که ایجاد می کنند، هستند [۸، ۹، ۱۱].

انتروباکتر کلوآکه یکی از شناخته شده ترین گونه های جنس انتروباکتر و به عنوان نماینده کمپلکس انتروباکتر کلوآکه در

تکثیر در یک مخلوط واکنش با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد، که شامل ۱۵/۶ میکرولیتر آب مقطر با درجه (grade) ملکولی، ۲/۵ میکرولیتر بافر تک پلیمراز X ۱۰، (۱۰ mM I<sup>-1</sup>) dNTPs ۰/۳ میکرو لیتر، ۰/۵U تگ DNA پلیمراز، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۶ میکرولیتر از MgCl<sub>2</sub> (۵۰ mM) و DNA 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 شامل دناتوراسیون 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 رنگ آمیزی 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 اتروباکتر کلواکه شناسایی شده بودند حداقل پروفایل API مورد قبول به عنوان اتروباکتر کلواکه عبارت از ۳، ۳۰۵، ۵۷۳، ۵۷ با سطح قابل قبول Good Identification و با ۹۵٪ شباهت با اتروباکتر کلواکه 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 قرار گرفتند [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 آنالین CLUSTALW2

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 مک‌کانکی 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. 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 ۱/۵ میلی‌لیتر 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 Hsp60-R (5'-ATG CAT AGG CGT GGT TGC-3) و TCG GTG GTG ATC ATC AG-3) جهت تکثیر ژنتیکی یک قطعه bp ۳۴۱ از ژن hsp ۶۰ مورد استفاده قرار گرفت [۴].

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 ۷ 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 تشخیصی ۶ بیمارستان بزرگ در تهران شناسایی شده بودند، ۸/۶۴٪ (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 آئروژنوز 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، ۳/۸۳٪ (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

مقایسه (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) 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. kobei* (AJ567888/1)، *E. asburiae* (AJ567893/1)، *E. cloacae* IV، *E. cloacae* III (AJ567880/1)، *E. ludwigii* (AJ543893/1)، *E. hormaechei* subsp. *Oharae* (AJ567891/1)، *E. hormaechei* subsp. *Hormaeche* (AJ866491/1)، *E. hormaechei* subsp. *Steigerwaltii* (AJ567892/1)، *E. nimipressuralis*، *cloacae* IX (AJ543878/1)، *E. cloacae* subsp. *Cloacae* (AJ567900/1)، *E. cloacae* subsp. *Dissolvens* (AJ543855.1/1)، *E. cloacae* sequence crowd (AJ417143/1) و در نهایت نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## نتایج

از ۷۴ جدایه اداری 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 (کوروباکتر) ساکازاکی (۱۲/۱۶٪) شناسایی شدند. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. جدایه‌های اداری تعیین هویت شده با کیت API 20E

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

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 زئوتیپ‌های 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.

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)

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

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

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 SrRNA<sub>۱۶</sub> 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

## بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات انجام شده توسط اوهارا و هافمن؛ سیستم‌های تجاری 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

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 و SrRNA۱۶ که جزء ژن‌های به اصطلاح house keeping هستند می‌تواند به این تقیصه 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

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 تجاری 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

[7] Fernandez-Baca V, Ballesteros F, Hervás JA, Villalón 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 Infect* 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  $\beta$ -lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. *Clin Microbiol Infect* 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 Aydhprdzan fan o homar; 1388. p. 154-172.

[13] Nucera DM, Maddox CW, Hoiem-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 *hlyA* polymerase chain reaction (PCR)-based assays. *African J Microbiol Res* 2012; 6: 5410-5416.

[16] Alizadeh-Hesar M, Bakhshi B, Najari-peeraeyeh 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.

نشده‌اند و یا مجموعه‌های کمپلکس باکتری‌ها مثل کمپلکس انتروباکتر کلوآکه که در پایگاه داده‌های این کیت‌ها اطلاعاتشان 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 سرشار 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 nomenclature *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.

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

Majid Akbari (M.Sc), Bita Bakhshi (Ph.D)\*, Shahin NajariPeerayeh (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 13 other 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 word:** *Enterobacter cloacae*, Chaperonin 60/genetics, Sensitivity and specificity, Cross Infection

---

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