پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۷ بهمن سال ۱۳۹۱ (۱۹۶-۱۸۹)

ارزش PCR در تشخیص باکتریمی تجربی در رات

حمید رضا هنرمند[۱]
معصومه فلاح قویدل[۲]
ایرج نیکوکار[۳]
مرتضی رهبر طارمسری[۴]
شروین قدرجانی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: باکتریمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی است. تشخیص سریع باکتریمی کمک بزرگی به درمان این عارضه مهم می‌کند و پزشک معالج را به انجام درمان هدفمند رهنمود می‌کند و تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر باکتری سبب ساز را امکان پذیر می‌نماید. باکتریمی ناشی از انتروکوک فکالیس بیشتر در بیمارستان‌ها شایع است و اغلب توسط سویه‌های مقاوم ایجاد می‌شود. روش متعارف تشخیص باکتریمی بسیار وقت‌گیر است و روش‌های سریع‌تر باید جایگزین گردند. هدف این مطالعه ارزیابی PCR در تشخیص سریع باکتریمی مدل رات است که به باکتریمی انسانی شباهت نزدیکی دارد.

مواد و روش‌ها: یک سویه استاندارد برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 cfu/ml به منظور تلقیح به تعداد ده رات برای ایجاد باکتریمی تجربی استفاده شد. از تمام رات‌ها در فواصل ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح، نمونه خون گرفته شد. برای تمام نمونه خون‌ها روش‌های تشخیصی متعارف و PCR انجام گردید و از ۱۰ نمونه خون رات‌های تلقیح نشده به عنوان شاهد استفاده شد.

یافته‌ها: کشت تمام نمونه خون رات ها مربوط به هر سه روز مثبت شد و به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد. در PCR تعداد دو نمونه خون رات مربوط به روز اول، ۷ نمونه روز دوم و ۸ نمونه روز سوم مثبت شدند. نتیجه روش متعارف و PCR برای نمونه‌های شاهد همگی منفی بود. حساسیت این روش ۶۹/۸ و ویژگی آن ۱۰۰درصد بوده است.

استنتاج: PCR در تشخیص باکتریمی انتروکوکی بسیار سریع‌تر از روش متعارف است و چون این سرعت در نتیجه درمان تأثیر بسیار زیادی دارد، آن‌را می‌توان یک تست جایگزین در نظر گرفت ولی برای افزودن حساسیت آن بهتر است از روش‌های کارآمدتر استخراج DNA استفاده نمود.

واژه های کلیدی: باکتریمی تجربی، انتروکوک فکالیس، PCR

مقدمه

انتروکوک فکالیس عامل ۸۵ تا ۹۰ درصد از عفونت‌های انتروکوکی بوده، عامل مهم ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است و اغلب موجب باکتریمی، سپتی سمی در کودکان، آندوکاردیت، عفونت‌های

مؤلف مسئول: حمیدرضا هنرمند- گیلان: دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی E-mail: honamand_36@yahoo.com
۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد لاهیجان
۳. دانشکده پرستاری- مامایی و پیراپزشکی شرق گیلان، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
۴. گروه پزشکی قانونی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
۵. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
تاریخ دریافت : ۸۹/۸/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۲/۳ تاریخ تصویب : ۹۱/۱۰/۱۶

Archive of SID
www.SID.ir

ادراری، و عفونت زخم‌ها می‌شود(۲،۱). سه مورد اول بیماری‌هایی هستند که به تشخیص سریع با ردیابی باکتری در خون نیاز دارند(۳) و این در نتیجه درمان و عواقب بیماری تأثیر تعیین‌کننده‌ای دارد(۴،۵). تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری نیز در موفقیت درمان نقش زیادی دارد(۶). اغلب سویه های بیمارستانی به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله به وانکومایسین مقاوم هستند(۷). انتقال باکتری در بیمارستان از طریق دست کارکنانی که ناقلین مدفوعی انتروکوک های مقاوم هستند و با بیماران تماس نزدیک دارند اتفاق می‌افتد و و بیشتر در بیمارانی که به مدت طولانی بستری بوده، آنتی‌بیوتیک به مدت طولانی دریافت کرده، یا در شرایط بحرانی (مثلاً در ICU) به سر می‌برند، اتفاق می‌افتد(۷،۱). کشت متداول‌ترین روش تشخیص انتروکوک ها در خون است(۲) ولی چون برای درمان باکتریمی، سرعت تشخیص اهمیت انکار ناپذیر دارد، استفاده از روش‌های سریع ترجیع داده می‌شود(۷). برای سرعت بخشیدن به روند تعیین هویت باکتری پس از کشت، از روش‌های نیمه خودکار API 20 و API 32 می‌توان استفاده نمود(۱۱- ۸). در سال‌های اخیر محیط کشت‌های انتخابی- افتراقی جدید و کرومو آگارهای مختلف ابداع و معرفی شدند که تشخیص باکتری و مقاومت آن‌را به طور خودکار امکان پذیر می‌کنند از جمله محیط‌های EVA و CNA-VGA و محیط کشت بایل اسکولین آزید آگار BEAA حاوی 6µg/ml وانکومایسن. این روش‌ها در مطالعات مختلف ارزیابی شده و حساسیت و ویژگی متفاوتی نشان داده‌اند با وجود بر این انجام آن‌ها و تأیید نهایی نتایج به ۲-۳ روز وقت نیاز دارد(۱۱،۱۰،۹،۳،۲). همواره دستیابی به روش سریع‌تر، ساده‌تر، کم هزینه‌تر و مطمئن مد نظر بوده است و در این راستا روش‌های مولکولی به ویژه PCR توسط چندین محقق آزموده شده است. در این مطالعه یک روش PCR متعارف با استفاده از یک جفت پرایمرهای اختصاصی، برای تشخیص باکتریمی انتروکوک فکالیسی تجربی در رات و جهت تعیین حساسیت و ویژگی آن در مقایسه با کشت، ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از سویه استاندارد انتروکوک فکالیس PTCC 1237 که به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه شده بود استفاده شد. ابتدا یک استوک دائمی و چند استوک کاری با تلقیح به TSB تهیه شد. استوک‌های کاری به محیط کشت TSA انتقال داده شدند. در این مطالعه روش متعارف بدین گونه اجرا شد که برای تشخیص در حد جنس، از آزمون‌های روتین کاتالاز؛ PYR، تحمل ۶/۵ درصد نمک، تحمل صفرا و تجزیه اسکولین در محیط کشت BEA و برای تفکیک گونه فکالیس از فسیوم از سه آزمون تخمیر قند سوربیتول، مصرف پیرووات و احیاء تلوریت استفاده گردید که در مطالعات قبلی تأیید شده‌اند(۱۲،۱۱). با استفاده از کلنی‌های تک، یک سوسپانسیون باکتریایی در سرم فیزیولوژیکی استریل تهیه شد و با معیار محلول نیم مک فارلند و کنترل دقیق با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۸۰ نانو متر، جمعیت باکتریایی آن در حد cfu/ml 10^8 تنظیم شد. برای ایجاد باکتریمی تجربی از تعداد ده رات هم نژاد، هم جنس، هم سن و تقریباً هم وزن استفاده شد. مقدار نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی ذکر شده به تمام رات‌ها تزریق شده و در فواصل ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آن‌ها نمونه خون گرفته شده و برای تمام نمونه‌ها روش متعارف و PCR انجام گردید. از تعداد ۱۰ نمونه خون رات های تلقیح نشده به عنوان شاهد استفاده شد و برای تمام آن‌ها نیز روش متعارف و PCR انجام گردید.

برای انجام کشت، مقدار نیم میلی‌لیتر از هر نمونه خون مورد آزمایش به یک میکروتیوب حاوی ۱/۵ ml محیط TSB به منظور غنی‌سازی اولیه انتقال داده شده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شد و سپس به محیط کشت TSA انتقال داده می‌شد و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوباسیون صورت می‌گرفت. پس از نمایان شدن کلنی‌ها، تمام تست‌های روتین ذکر شده انجام می‌شد. برای استخراج DNA مقدار ۴۰۰ µl از هر نمونه مورد آزمایش به طور جداگانه به یک میکوتیوب ۲ ml انتقال داده شده و مقدار ۴ حجم (µl) ۱۶۰۰ آب مقطر استریل به آن اضافه شده و به مدت یک ساعت در یخچال قرار داده می‌شد تا خون به طور کامل لیز شود و بعد با دورrpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام می‌گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شده و به رسوب حاصله پس از یک بار شستشو با PBS مقدار ۲۰۰ µl لیز بافر مخصوص باکتری‌های گرم مثبت و مقدار ۱۰ µl لیزوزیم (۰/۱ mg/ml) اضافه شده و در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت انکوبه می‌شد. سپس مقدار ۲ µl پروتئیناز K (۱۸/۷ mg/ml) افزوده شده و در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت دیگر انکوباسیون انجام می‌شد. سپس استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم و رسوب دادن DNA با استفاده از الکل ایزو پروپانول انجام می‌گردید.

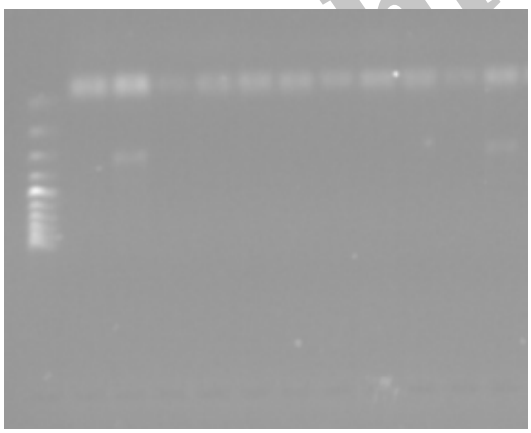
مخلوط PCR با فرمول زیر و به حجم نهایی مقدار ۲۵ µl تهیه می‌شد: مقدار ۳ µl از PCR Buffer 10 x، مقدار ۲ µl از (25mM) Mgcl2، مقدار ۰/۵. µl از dNTP (10mM، مقدار ۱۰۰ پیکو مول از هر پرایمر، مقدار یک واحد آنزیم DNA pol و ۲ µl از DNA استخراج شده و افزودن آب مقطر تا حجم ۲۵ µl. توالی پرایمرهایی که در این مطالعه استفاده شدند شامل:

اندازه قطعه	توالی پرایمر	ژن
۳۲۰	5-ATC AAG TAC AGT TAG TCT TTA G-3 5- ACG ATT CAA AGC TAA CTG AAT CAG T-3	16sr RNA

برنامه PCR بدین صورت اجرا گردید: ۷ دقیقه دنا توراسیون اولیه با دمای ۹۴ درجه، تعداد ۳۴ سیکل شامل ۴۰ ثانیه دناتوراسیون با دمای ۹۴ درجه، ۴۰ ثانیه Anealing با دمای ۴۶ درجه، ۵۰ ثانیه Extension با دمای ۷۲ درجه و بالاخره ۱۵ دقیقهfinal extension با دمای ۷۲ درجه. محصول PCR روی ژل آگارز ۱درصد و حاوی اتیدیوم بروماید به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز می‌شد و سپس با ژل داک عکس‌برداری به عمل می‌آمد.

یافته‌ها

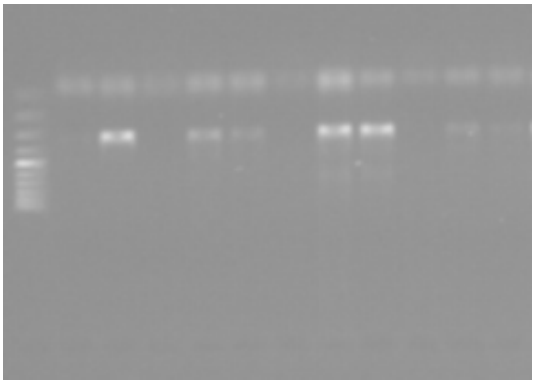
کشت تمام نمونه خون رات ها مربوط به هر سه روز مثبت شد و به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد. ولی در PCR تعداد دو نمونه خون رات مربوط به روز اول و ۷ نمونه روز دوم و ۸ نمونه روز سوم مثبت شدند (تصاویر شماره ۱و۲و۳). مدت زمان اجرای کامل روش روتین ۴ روز و برای PCR ۸ ساعت (معادل یک روز کاری) بود. نتیجه روش متعارف و PCR برای نمونه‌های شاهد همگی منفی بود. حساسیت این روش ۶۹/۸ و ویژگی آن ۱۰۰ درصد برآورد گردید.



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

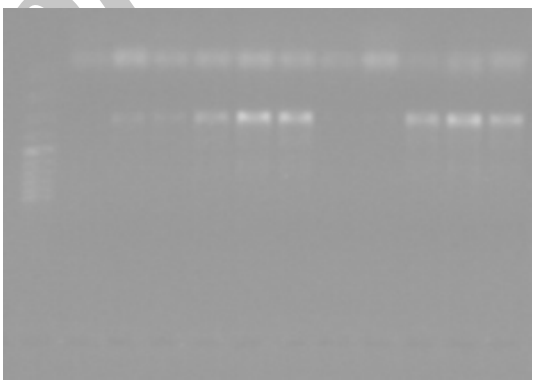
تصویر شماره ۱ : نتیجه PCR برای نمونه خون روز اول رات ها تلقیح شده با سویه ۱۲۳۷با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی گونه انتروکوک (ژن ریبوزومی 16S rRNA). ردیف L: لادر ۱۰۰bp. ردیف ۱: کنترل منفی. ردیف ۲ تا ۱۱ نمونه خون روز اول رات ها. باند اختصاصی ۳۲۰ bp در ردیف دوم و یازدهم مشاهده می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

تصویر شماره ۲: نتیجه PCR برای نمونه خون روز دوم رات ها تلقیح شده با سویه ۱۲۳۷با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی گونه انتروکوک (ژن ریبوزومی 16S rRNA). ردیف L: لادر ۱۰۰bp . ردیف ۱: کنترل منفی. ردیف ۲ تا ۱۱ نمونه خون روز دوم رات ها. در ردیف‌های دوم و چهارم، پنجم، هفتم، هشتم، دهم و یازدهم باند اختصاصی ۳۲۰ bp مشاهده می‌شود.



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

تصویر شماره ۳: نتیجه PCR برای نمونه خون روز سوم رات ها تلقیح شده با سویه ۱۲۳۷با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی گونه انتروکوک فکالیس(ژن ریبوزومی 16S rRNA). ردیف L: لادر۱۰۰bp . ردیف ۱ : کنترل منفی. ردیف ۲ تا ۱۱ نمونه خون روز سوم رات ها ۴۷. باند اختصاصی ۳۲۰ bp در ردیف دوم و سوم و چهارم، پنجم، ششم، نهم، دهم و یازدهم مشاهده می‌شود.

بحث

روش متعارف به اقدامات متعددی نیاز دارد، پر هزینه و وقت گیر است، برای تشخیص موارد باکتریمی، سپتی سمی و آندوکاردیت که باید هرچه سریع‌تر تشخیص داده شوند مناسب نیست و برای غربالگری حاملین مدفوعی در امور نظارت بیمارستانی که تعداد نمونه‌ها زیاد است و تکرار دوره‌ای غربالگری لازم است نیز پر هزینه و وقت گیر است. به همین دلیل همواره دستیابی به یک روش سریع‌تر،ساده تر، ارزان‌تر، و مطمئن مد نظر بوده است. شناسایی و تعیین هویت باکتری با کمک سیستم‌های تجاری API 20 و API 32 و آگار پلیت های تجاری مختلف در چند مطالعه ارزیابی شدند و حساسیت و ویژگی متفاوت نشان داده‌اند(۱۴-۱۲). محیط کشت‌های EVA و CNA-VGA و بایل اسکولین آزید آگار (BEAA) حاوی 6µg/ml وانکومایسن نیز در مطالعات مختلف ارزیابی شده‌اند(۲، ۱۲،۱۱،۳). EVA در مقایسه با CNA-VGA کارآیی بهتری دارد زیرا بر روی CNA-VGA بعضی از باکتری‌های گرم منفی و مخمرها رشد می‌کنند ولی یک مزیت دارد و آن این است که سرعت رشد انتروکوک بر روی آن زیاد تر است و ظرف ۲۴ ساعت اندازه کلنی‌ها بقدر کافی بزرگ می‌شود که پاساژ داده شوند ولی در محیط EVA لااقل ۴۸ ساعت وقت لازم است تا کلنی‌ها قابل مشاهده شوند(۱۵،۱۲). مجموع کارهای اجرایی روش متعارف که در مطالعه ما نیز استفاده شد تا رسیدن به نتیجه قطعی معمولاً بیش از سه روز به طول می‌انجامد. بنابراین روش‌های تشخیص مولکولی به ویژه PCR که کاربردی‌ترین آن‌ها است می‌تواند جایگزین مناسبی باشند. PCR برای تشخیص انتروکوک در حد جنس و گونه و برای تعیین ژن مقاومت دارویی آن توسط چند محقق، در مطالعات جداگانه، ارزیابی شده و چند پرایمر نیز از توالی‌های ژن 16sr RNA و برخی ژن‌های دیگر برای تشخیص در حد جنس و گونه طراحی شده‌اند(۱۷،۱۶).

علت پایین بودن حساسیت PCR در مطالعه ما را می‌توان به مشکلات تکنیکی استخراج باکتری از خون تام نسبت داد. استخراج DNA باکتریایی با غلظت کافی و کیفیت مطلوب، از خون تام که تنها نمونه بالینی برای

Archive of SID

www.SID.ir

تشخیص باکتریمی است، دشوار است. معمولاً حجم کمی از خون برای استخراج DNA استفاده می‌شود که تعداد اندکی باکتری در خود دارد و تعداد زیادی سلول‌های قرمز و سفید خونی با مقادیر زیادی لیپو پروتئین‌ها و پروتئین‌ها موجودند که اغلب آن‌ها مهار کننده‌های PCR هستند(۱۹). برای برطرف کردن این مشکل Zang و همکاران از کیت تجاری کیاژن برای استخراج DNA از خون استفاده کردند و توانستند وجود ۵ Cfu/ml باکتری استرپتوکوک پنومونیه را در خون با آن تشخیص بدهند(۲۰). Newcomb و همکاران از روش Boom برای استخراج DNA نیسریا منتزیتیدیس از خون بیماران استفاده کردند(۲۱).

Klausegger و همکاران از بافر DNA Zol برای لیز کردن همزمان باکتری‌ها و سلول‌های خونی استفاده کردند(۲۲) Anthony و همکاران لیز سلول‌های خونی را با آب مقطر انجام داده وDNA را با روش جوشاندن استخراج کردند(۲۳) Rothman و همکاران از روش غنی‌سازی جمعیت باکتریایی اولیه نمونه خون ، با تلقیح آن به محیط کشت TSB و انکوباسیون کوتاه مدت (۴ تا ۶ ساعت) استفاده کردند و سپس استخراج DNA را انجام دادند(۲۴). مزیت این روش در این است که پس از انجام استخراج DNA می‌توان از همان کشت برای پاساژ دادن به محیط کشت جامد استفاده نمود.

در مطالعات Stake و همکاران(۱۶)، Dutka-Malen و همکاران(۱۷)، Jayartne و همکاران(۱۸)، Patel و همکاران(۱۹)، Angeletti و همکاران(۲۵) و Paule و همکاران(۲۶) بر روی ایزوله های بالینی صورت گرفت و مطالعات Ke و همکاران(۲۷) و Kariyama و همکاران(۲۸) بر روی سویه های استاندارد انجام شد. Stake و همکاران برای افزودن حساسیت PCR، غنی‌سازی و افزایش جمعیت اولیه انتروکوک ها در نمونه مدفوع را بکار بردند و توانستند حساسیت PCR را به ۸۵ درصد و ویژگی آن‌را به ۱۰۰ درصد برسانند(۱۶). Jayartne و همکاران حساسیت این روش را ۹۵/۴ و ویژگی آن‌را ۹۹/۸ درصد گزارش کردند و آن‌را ارزان‌تر و سریع‌تر از کشت (۴۸ ساعت در برابر ۹۶ ساعت) ارزیابی نمودند(۱۸). در مطالعات Angeletti و همکاران(۲۵) و Paule و همکاران(۲۶) نیز روش تشخیص مولکولی حساس‌تر از کشت اعلام گردید. در حالی که حساسیت کشت در مطالعه ما بیشتر بود و بنظر می‌رسد روش استخراج DNA در مطالعه ما کارآمد نبوده است. در مطالعه Kariyama و همکاران نیز روش PCR ساده‌تر و کارآمد تر ارزیابی شد(۲۸). در تمام مطالعات ذکر شده و نیز در مطالعه ما روش روتین وقت‌گیر و کندتر ازPCR بوده است. یکی از عیب‌های PCR در مقایسه با کشت این است که PCR ژن‌های DNA باکتری‌های مرده را نیز تکثیر می‌دهد و تست مثبت کاذب می‌شود و این نکته در مورد تشخیص باکتریمی‌های بالینی نه تجربی اهمیت دارد زیرا با مصرف آنتی‌بیوتیک و با دخالت دستگاه ایمنی بدن، احتمال وجود باکتری‌های کشته شده در خون بالا می‌رود و PCR نمی‌تواند آن‌ها را تفکیک دهد در حالی که در روش روتین تنها باکتری‌های زنده رشد کرده و کلنی تشکیل می‌دهند.

مشکل دیگر ویژگی پرایمر است که بتواند فقط گونه های انتروکوک را تشخیص دهد و باکتری‌های دیگر را فرا نگیرد. پرایمر های Ke و همکاران(۲۷) دو گونه باکتری از جنس آبیوتروفیا و چهار گونه از جنس لیستریا را نیز فرا می‌گرفت. با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی‌تر این مشکل را می‌توان برطرف نمود. مطالعه ما با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط Kariyama صورت گرفت و مشکل مزبور مطرح نبود(۲۸). در ضمن اگر پرایمرها طوری باشند که انتروکوک را فقط در حد جنس شناسایی کنند، برای شناسایی در حد گونه باید به اقدامات دیگر از قبیل RFLP بر روی محصولPCR آن‌گونه که Patel و همکاران(۲۶) استفاده نمودند، متوسل شد و یا این‌که PCR را با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه انجام داد.

Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعه ما از پرایمر اختصاصی گونه استفاده شد. با وجودی که PCR نسبت به کشت یک روش جدید و مبتنی بر پیشرفت‌های تکنولوژیکی سال‌های اخیر است ولی به دلیل مشکلات تکنیکی متعدد که در اجرای آن وجود دارد و به خاطر این که در موفقیت این تست عوامل بسیار زیادی دخالت دارند که همگی باید به درستی کنترل شوند، اجرای آن به اندازه کشت ساده نیست. REAL TIME-PCR در مقایسه باPCR متعارف سریع‌تر است ولی هزینه و پیچیدگی زیادتری دارد و چون تفاوت زمانی آن با PCR متعارف خیلی زیاد نیست چندان توصیه نمی‌شود. شایان ذکر است که پیشرفت‌های تکنولوژیکی در عرصه کشت و روش‌های سنتی نیز ابداعات جدیدی صورت گرفته است. به تازگی یک محیط کشت تجاری کروموژنیک به نام VRE-BMX توسط شرکت Biomerieu معرفی شده است که می‌تواند گونه‌های فکالیس و فسیوم را تفکیک کند، و مانع رشد انتروکوک‌های حساس به وانکومایسین می‌شود بنابراین با قدرت تفکیکی بالا، فقط گونه‌های مقاوم و در حد گونه روی آن رشد می‌کنند و نیازی به انجام تست‌های تکمیلی برای تعیین هویت باکتری نیست. این محیط کشت برای نمونه های خون و مدفوع مناسب است ولی نمونه مدفوع را باید قبل از تلقیح به پلیت با آب مقطر استریل کمی خیسانده و رقیق نمود و زمان تکمیل تست ۲۴ تا ۴۸ ساعت است(۲۹). در این‌جا انجام یک مطالعه برای مقایسه دقیق‌تر روش‌های جدید کشت با PCR توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات آقای مجتبی حسین پور قدر دانی به عمل می‌آید.

References

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Mc Graw Hill 2007: 243-245.
2. Relmer LG, Wilson ML, Wenstein MP. Update on clinical detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Review 1997; 10(3): 444-465.
3. Andrade SS, Bisop PJM, Gales AC. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. Shock 2008; 30: 41-45.
4. Remco P, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls C. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. Pediatric Research 2005; 58(1): 143-148.
5. Klouche M, Schroder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. Clin Chem Lab Med 2008; 46: 888-908.
6. Vincent GL, Abraham L. The last ten years of sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173: 256-263.
7. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. Clinical Microbiology and Infection 2009; 15(6): 544-551.
8. Devriese LA, Pot B, Collins P. Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenitically distinct enterococcal species and species group. J Appl Bacteriol 1993; 75: 399-408.
9. Kanchana MV, Deneer VH, Blondeau J. Cost effective algorithm for detection and identification of vancomycin-resistant enterococci in surveillance culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 366-369.
10. Sahm DF, Free L, Smith C, Eveland M, Mandy LM. Rapid characterization schems for surveillance isolates of vancomycin-

Archive of SID

www.SID.ir

resistant enterococci. J Clin Microbiol 2007; 35: 2026-2030.

11. Gosiewski T, Kasprzyk A, Strus M. Comparision of the sensitivity of detection of bacteria in human blood using classic culture methods and molecular techniques: PCR and FISH. Med Dosw Mikrobiol 2005; 57(3): 319-325.
12. Van-Horn KG, Gedris CA, Rodney KM. Selective isolation of vancomycin-resistanct enterococci. J Clin Microbiol 1996; 34: 924-927.
13. Hamilton-Miller JMT, Shah S. Identification of clinically isolated vancomycin-resistant enterococci: comparison of API and BBL crystal system. J Med Microbiol 1999; 48: 695-696.
14. Sader HS, Biedenbach D, Jones RN. Evaluation of Vitek and API20s for species identification of enterococci. Diag Microbiol Infect Dis 1995; 23: 315-319.
15. Landman D, Quale JM, Qydna E, Willey B, Ditore V, Zaman M, et al Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1996; 34: 751-752.
16. Stake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. J Clin Microbiol 1997; 35(9) : 2325-2330.
17. Dutka-Malen S, Evers S, Courvallin P. Detection of glycopeptides resistance genotype and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33(1): 24-27.
18. Jayaratne P, Rutherford C. Detection of clinically resistant genotypes of vancomycin-resistent enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. J Clin Microbiol 1999; 37(6): 2090-2092.
19. Shiqiang S, Guoxian C, Yidong W, Lizhong D; Zhengyan Z. Rapid Diagnosis of Bacterial Sepsis with PCR Amplification and Microarray Hybridization in 16S rRNA Gene. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3147-3152.
20. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadiwsky RM, Rydquiost-White J, Poist C, Ehrlich GD. Detection of streptococcus pneumonia in whole blood by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 596-601.
21. Newcombe J, cartwwright K, Palmer WH, Mc Fadden J. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. J Clin Microbiol 1996; 34: 1637-1640.
22. Klausegger A, Hell M, Berger A, Zinober K, Baier S, Jones N, et al. Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. J Clin Microbiol 1999;
23. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23sr ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 781-788.
24. Rothman RE, Majmodar MD, Kelen JD, Madico G, Gaydod CA, Walker T, et al. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16sr RNA primers in a decontaminated PCR assay. J Infect Dis 2002; 186: 1677-81.
25. Angeletti S, Lorino G, Gheradi G, Battistoni F, De Cesaris M, Dicounzo G. Routin molecular identification of enterococci by gene specific PCR and 16s ribosomal DNA sequencing. J Clin Microbiol 2001; 30(2): 794-797.
26. Paule SM, Trick WE, Tenover FC, Lankford M, Canningham S, Stosor V, et al. Comparison of PCR assay to culture for

Archive of SID
www.SID.ir

surveillance detection of vancimycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4805-4807.

27. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menrad C, Roy PH, Ouellette M, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3497-3503.
28. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin enterococci. J Clin Microbiol 2000; 38(8) : 3092-3095.
29. Lederboer N, Das K, Eveland M, Roger-Dalber C, Mailler S, Chatellier S, et al. Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1556-1560.

Archive of SID

www.SID.ir