مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۱۱۰-۱۰۵

شناسایی سریع ایزوله های انتروکوکوس فکالیس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR)

سمیرا سبزی (MSc)[۱]، سولماز اوحدیان مقدم (PhD)[۲]، زهرا پاکباز (PhD)[۳]، محمدرضا پورمند (PhD)[۴*]

۱-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲-مرکز تحقیقات سرطان های دستگاه ادراری و تناسلی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات اورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- مرکز تحقیقات زیست فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۷/۶/۵، اصلاح: ۹۷/۹/۱۳، پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: انتروکوکوس فکالیس به عنوان یک پاتوژن مهم در عفونت های بیمارستانی مطرح می باشد. شناسایی سریع انتروکوکوس فکالیس در عفونت های خطرناک به خصوص در افراد با نقص ایمنی مسئله مهمی به شمار می رود. هدف از انجام این مطالعه بررسی کارایی ژن *ef0737* در شناسایی ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و گونه های مشابه شامل انتروکوکوس فیسیوم و استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی ۱۵۰ ایزوله بالینی شامل ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فیسیوم و ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از منابع مختلف عفونت جمع آوری شد. طراحی پرایمر با استفاده از توالی ژن *ef0737* انجام شد و همه ایزوله ها از نظر حضور ژن*ef0737* با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. حساسیت PCR بر اساس ایزوله های بالینی انتروکوکوس فکالیس و اختصاصیت پرایمرها بر اساس ایزوله های غیر انتروکوکوس فکالیس شامل ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فیسیوم و ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از مجموع ۱۵۰ ایزوله بالینی (۵۰ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فیسیوم و ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس) همه ایزوله های انتروکوکوس فکالیس از نظر حضور ژن *ef0737* مثبت و حساسیت تست ۱۰۰٪ محاسبه شد. همچنین ایزوله های انتروکوکوس فیسیوم و استافیلوکوکوس اورئوس همگی از نظر حضور ژن *ef0737* منفی شدند که نشانگر اختصاصیت پرایمرها بود.

نتیجه گیری: PCR بر اساس نتایج این مطالعه یک روش حساس و کاربردی در شناسایی سریع انتروکوکوس فکالیس به خصوص در بیماران با شرایط بحرانی می باشد. شناسایی ژن حفاظت شده *ef0737* در نمونه های بالینی احتمالا منجر به تشخیص سریع عفونت ناشی از انتروکوکوس فکالیس می شود.

واژه‌های کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، *ef0737*، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR).

مقدمه

انتروکوکوس فکالیس به عنوان مهمترین گونه جنس انتروکوکوس، بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان است که در بیماران بستری در بیمارستان می تواند عامل مهم عفونت های جدی شامل عفونت زخم؛ عفونت های ادراری ؛ عفونت های خونی و اندوکاردیت باشد(۲و۱). بر اساس گزارشات اپیدمیولوژیکی امروزه انتروکوکوس یکی از پاتوژن های مهم بیمارستانی با میزان مرگ و میر بالای ۶۰٪ در بین بیماران می باشد(۳). بنابراین شناسایی سریع و صحیح انتروکوکوس فکالیس در نمونه های بالینی جهت شروع درمان و جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم بسیار ضروری است(۴). روش های متداول در تشخیص انتروکوکوس فکالیس بر پایه کشت و تست های فنوتیپی می باشد(۵). روش های فنوتیپی محدودیت ها و خطاهای تشخیصی زیادی را به همراه دارند. مطالعات مختلفی تشخیص اشتباه انتروکوکوس فکالیس را با سایر کوکسی های گرم مثبت نشان می دهند که تمام این شواهد می تواند باعث بروز مشکل در درمان بیماران و کنترل عفونت در بیمارستان شود(۷و۶). در سال های اخیر روش های مولکولی جهت افزایش حساسیت در تشخیص عفونتها معرفی شدند. تکنیکPCR امروزه به طور وسیعی به عنوان یک روش کاربردی و قابل قبول در تشخیص عفونتهای باکتریایی توسعه یافته است(۸). این روش به عنوان یک روش جایگزین کشت و روشهای فنوتیپی جهت کاهش زمان شناسایی و به حداقل رساندن اشتباهات تشخیص مطرح میباشد(۹). در مطالعات مختلف، ژن های متنوعی برای تشخیص انتروکوکوس فکالیس در نمونه های بالینی استفاده شده است. برخی از این ژن‌ها مانند *rrs* و *ddls* مارکرهای مناسبی جهت تشخیص انتروکوکوس فکالیس در نمونه های

این مقاله حاصل پایان نامه سمیرا سبزی دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۳۲۷۶۱ دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا پورمند
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی. تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۵۴۹۱۰
E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

خونی می باشند(۱۰). برخی دیگر از ژن‌های ویرولانس مانند *gelE*، *esp*، *hyl* و *efa* نیز مورد بررسی قرار گرفته اند که حضور آنها در همه ایزوله ها تایید نشده است(۱۳-۱۱).

از آنجائیکه تاکنون مطالعه ای مبنی بر شناسایی مولکولی انتروکوکوس فکالیس با استفاده از ژن *ef0737* که پروتئین *EF0737* را کد می‌کند(۱۴) صورت نگرفته است. و با توجه به اینکه ژن *ef0737* در همه ایزوله های انتروکوکوس فکالیس با توالی معینی وجود دارد. بنابراین به نظر می رسد*ef0737* می تواند به عنوان مارکر ژنتیکی جدید در راستای تشخیص بالینی انتروکوکوس فکالیس مفید باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی کارایی ژن *ef0737* در تشخیص مولکولی ایزوله های انتروکوکوس فکالیس می باشد.

مواد و روش‌ها

روش جمع آوری ایزوله ها: این مطالعه مقطعی پس از تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1396.2067 بر روی ۱۵۰ ایزوله بالینی (تایید شده با تست های فنوتیپی) که از عفونتهای مختلف شامل عفونت خون؛ عفونت ادراری و عفونت زخم از بیمارستان های مربوط به دانشگاه علوم پزشکی تهران در بازه زمانی فروردین تا مرداد ۱۳۹۵ جمع آوری شدند، انجام گردید. این ایزوله ها شامل ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فیسیوم و ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از آنجا که هیچ مطالعه ای درباره این ژن و حضور آن در دو باکتری انتروکوکوس فیسیوم و استافیلوکوکوس اورئوس انجام نشده است، بنابراین نسبت وجود ژن در هر باکتری ۰/۵ در نظر گرفته شد و تعداد ایزوله ها طوری تعیین شد که با اطمینان ۹۵٪ و حداکثر خطای ۱۵٪ بتوان نسبت این ژن را برآورد کرد. تعداد ایزوله برای هر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فیسیوم با توجه به فرمول مربوطه بدست آمد.

استخراج ژنوم: ژنوم ایزوله ها توسط کیت استخراج DNA متعلق به شرکت Bioneer کره مطابق دستورالعمل آن استخراج شد.

بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR): پرایمرهای اختصاصی بر اساس اطلاعات ژن *ef0737* در پایگاه GenBank آنالیز و طراحی شد. توالی ۲۶ جفت بازی پرایمر Forward (3′ -ATGTCTAAATTTTTAAAAGTAATCGG- 5′) و ۲۵ جفت بازی پرایمر Reverse (3′ -CTGCTCATCTCTATTTATTTTTTTA- 5′) برای تکثیر محصول ۱۵۸۷ جفت بازی در تکنیک PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

سویه استاندارد ATCC29212 انتروکوکوس فکالیس به عنوان کنترل مثبت و میکروتیوب حاوی مواد واکنش به غیر از DNA به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. نتایج مثبت جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. تکنیک PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر Mastermix (سیناکلون؛ ایران)؛ ۲ میکرولیتر DNA ؛ ۱ میکرولیتر از هر پرایمر(pmol/µl ۲۰) و ۹ میکرولیتر آب مقطر دوبار استریل طبق برنامه زیر انجام شد:

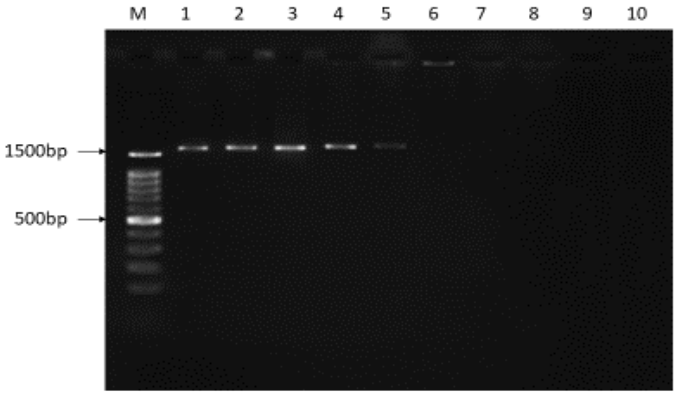
یک دوره دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سی دوره تکثیر محصول شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و نهایتا یک دوره دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. تمامی محصولات در ژل آگارز یک درصد (ولتاژ ۹۰، به مدت ۲ ساعت) مورد بررسی قرار گرفتند.

حساسیت و محدودیت تشخیص تکنیک PCR: رقت سریالی ۱۰ برابری DNA در آب مقطر استریل تهیه و تکنیک PCR با هریک از غلظت های متفاوت انجام شد. همچنین حساسیت PCR با استفاده از ۵۰ ایزوله بالینی انتروکوکوس فکالیس مورد بررسی قرار گرفت.

اختصاصیت پرایمرهای PCR: اختصاصیت PCR با استفاده از ایزوله‌های غیر انتروکوکوس فکالیس شامل انتروکوکوس فیسیوم و استافیلوکوکوس اورئوس تعیین گردید.

یافته ها

بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به طور کلی، ۱۵۰ ایزوله بالینی انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فیسیوم و استافیلوکوکوس اورئوس به منظور حضور ژن ۱۵۸۷ جفت بازی *ef0737* در تکنیک PCR در این مطالعه بررسی شدند. نتایج مطالعه ما حضور این ژن را در همه ایزوله های بالینی انتروکوکوس فکالیس و عدم حضور آن را در ایزوله های انتروکوکوس فیسیوم و استافیلوکوکوس اورئوس نشان می دهد (شکل۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *ef0737* با وزن حدود ۱۵۸۷ جفت بازروی ژل آگارز ۱ درصد. M: مارکر ۱۰۰ bp (Gene On, Germany) ؛ ۱: کنترل مثبت ؛ ۵-۲: انتروکوکوس فکالیس؛ ۷-۶: انتروکوکوس فیسیوم ؛ ۹-۸: استافیلوکوکوس اورئوس؛ ۱۰: کنترل منفی

حساسیت و محدودیت تشخیص PCR: تهیه سریال رقت DNA به منظور کمترین حد تشخیص PCR (با استفاده از پرایمرهای *ef0737*) انجام شد که نتایج حاصل از تکثیر نشان داد کمترین مقدار DNA قابل تشخیص ۱۰ کپی در هر واکنش است. همچنین نتایج PCR برای ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فکالیس مثبت بود که حساسیت تست با استفاده از جدول ۲×۲ حساسیت ۱۰۰٪ محاسبه شد.

اختصاصیت PCR: اختصاصیت تست با استفاده از ایزوله های غیر انتروکوکوس فکالیس انجام و نتایج منفی تست نشان دهنده پرایمرهای اختصاصی است که فقط ایزوله های انتروکوکوس فکالیس را شناسایی می کنند . اختصاصیت تست ۱۰۰٪ محاسبه شد.

نتایج تعیین توالی: نتایج تعیین توالی *ef0737* با توالی موجود در GenBank مقایسه و مشخص شد که توالی ژن *ef0737* با توالی موجود در GenBank کاملا یکسان است و هیچ موتاسیونی در توالی ژن مشاهده نشد. آنالیز نتایج و بررسی های بیوانفورماتیک (BLAST) نشان می دهند این ژن در سویه های مختلف انتروکوکوس فکالیس کاملا مشابه است و در سایر باکتری ها یافت نمی شود.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه که از تکنیک Polymerase chain reaction برای شناسایی اختصاصی انتروکوکوس فکالیس با هدف قرار دادن ژن *ef0737* استفاده شد، نتایج حاصل، حساسیت و اختصاصیت این روش را برای ایزوله های انتروکوکوس فکالیس نشان داد. در مطالعات پیشین اهمیت عفونتهای انتروکوکی در مناطقی از ایران نشان داده شد (۱۶و۱۵).

اگرچه امروزه روش‌های فنوتیپی بر پایه کشت به منظور تشخیص پاتوژن ها و تعیین مقاومتهای آنتی بیوتیکی در آزمایشگاه های میکروب شناسی متداول هستند، در برخی موارد خاص، نیاز اضطراری به تشخیص سریع پاتوژن به منظور شناسایی عفونت و تصمیمات درمانی وجود دارد(۱۸و۱۷). از طرف دیگر از دست رفتن قابلیت کشت انتروکوکوس فکالیس در شرایط نامناسب بر روی محیطهای کشت، به دلیل ورود این باکتری به حالت زنده غیر قابل کشت (Viable But Non-culturable Cells) می باشد. این در حالی است که در موقعیت VBNC، باکتری زنده، از نظر متابولیکی فعال و فاکتورهای ویرولانس خود را بیان می‌کند اما بر روی محیط های کشت کلنی تشکیل نمی‌دهد (۱۹). مطالعات زیادی به اهمیت تشخیص مولکولی و محدودیت‌های تشخیص فنوتیپی اشاره کرده اند. در مطالعه ای که توسط Velasco و همکارانش انجام شد مشخص شد ارتباطی بین روش‌های فنوتیپی و روش ژنوتیپی PCR برای تشخیص گونه های انتروکوکوس وجو ندارد. نتایج آنها بر اساس روش فنوتیپی باعث شناسایی اشتباه ۱۵٪ ایزوله های انتروکوکوس فیسیوم شد که با روش PCR و ژن هدف *ddls* ایزوله ها به درستی تشخیص داده شدند(۲۰).

در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که ژن *ef0737* بدون استثنا در همه ایزوله های بالینی انتروکوکوس فکالیس وجود دارد. این ژن به عنوان یک ژن محافظت شده به منظور تشخیص اختصاصی ایزوله های بالینی انتروکوکوس فکالیس که در گونه های مشابه حضور ندارد تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. مطالعاتی درباره شناسایی عناصر ژنتیکی انتروکوکوس مانند *esp*، *hyl*، *asa1*، *van*، *ddls* (۲۱) و همچنین *gelE*، *esp*، *cylA*، *hyl* و *ace* (۲۲) انجام شده و مشخص گردید که این ژنها در همه ایزوله های انتروکوکوس فکالیس وجود ندارند. در مطالعه قبلی ما بر روی پروتئین EF0737 که توسط ژن *ef0737* کد می شود، نتایج نشان داد که این پروتئین با سرم بیماران مبتلا به عفونت ناشی از انتروکوکوس فکالیس واکنش داده و در طی عفونت بیان می شود(۲۳). لذا این ژن احتمالا مارکر مناسبی جهت تشخیص عفونت انتروکوکوس فکالیس می باشد که نیازمند مطالعات گسترده تر و استفاده از این ژن در نمونه های بالینی می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت‌های مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران و همچنین از همکاری کارکنان مرکز تحقیقات اورولوژی بیمارستان سینا، تقدیر و تشکر می گردد.

Rapid Identification of *Enterococcus Faecalis* Isolates by Polymerase Chain Reaction

S. Sabzi (MSc)[1], S. Ohadian Moghadam (PhD)[2], Z. Pakbaz (PhD)[3], M.R. Pourmand (PhD)*[4]

1.Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
2.Uro-Oncology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
3.Urology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
4.Biotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 105-110
Received: Aug 27th 2018, Revised: Dec 4th 2018, Accepted: Jan 9th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Rapid detection of *Enterococcus faecalis* as a frequent cause of nosocomial infections in immunocompromised patients is an important issue. Herein, the current study developed a PCR assay based on the *ef0737* gene to detect *E. faecalis* isolates.

METHODS: In this cross-sectional study, 150 clinical isolates including *E. faecalis*, *E. faecium* and *Staphylococcus aureus* were collected. A set of pair primers was designed using the sequence of *ef0737*. All isolates were examined for the presence of *ef0737* gene by PCR assay. The sensitivity of PCR assay was evaluated according to 50 clinical isolates of *E. faecalis*. The specificity of PCR primers was also determined using non-*E. faecalis* species including 50 *E. faecium* and 50 *S. aureus* isolates.

FINDINGS: In this study, from 150 clinical isolates that were collected; all the 50 *E. faecalis* isolates showed positive results for the *ef0737* gene which showed 100% sensitivity. No amplification were observed in other isolates include *E. faecium* and *S. aureus*.

CONCLUSION: PCR assay is a more efficient and sensitive tool for detection and characterization of *E. faecalis* especially in patients with the critical condition. Identification of the preserved *ef0737* gene in clinical samples may be able to determine infections caused by *E. faecalis.*

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis, ef073, PCR.*

Please cite this article as follows:

Sabzi S, Ohadian Moghadam S, Pakbaz Z, Pourmand MR. Rapid Identification of Enterococcus Faecalis Isolates by Polymerase Chain Reaction. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:105-10.

***Corresonding Author: M.R. Pourmand (PhD)**
Address: Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
Tel: +98 21 88954910
E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

References

1.Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J, Rodríguez CM, Cantón R, Willems RJ, et al. Population biology of intestinal Enterococcus isolates from hospitalized and non-hospitalized individuals in different age groups. Appl Environ Microbial. 2015;81(5):1820-31.

2.Kajihara T, Nakamura S, Iwanaga N, Oshima K, Takazono T, Miyazaki T, et al. Clinical characteristics and risk factors of enterococcal infections in Nagasaki, Japan: a retrospective study. BMC Infect Dis. 2015; 15:426.

3.Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology. 2009;155(6):1749-57.

4.Wellinghausen N, Bartel M, Essig A, Poppert S. Rapid identification of clinically relevant Enterococcus species by fluorescence in situ hybridization. J Clin Microbiol. 2007;45(10):3424-6.

5.Tsai JC, Hsueh PR, Lin HM, Chang HJ, Ho SW, Teng LJ. Identification of clinically relevant Enterococcus species by direct sequencing of *groES* and spacer region. J Clin Microbiol. 2005;43(1):235-41.

6.Vincent JL, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K, et al. Rapid diagnosis of infection in the critically ill, a multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile site infections. Crit Care Med. 2015;43(11):2283-91.

7.Kirschner C, Maquelin K, Pina P, Ngo Thi NA, Choo-Smith LP, Sockalingum G, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. J Clin Microbiol. 2001;39(5):1763-70.

8.Barghouthi SA. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. Indian J Microbiol. 2011;51(4):430-44.

9.Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Front Microbial. 2014; 5:770.

10.Honarm H, Falah Ghavidel M, Nikokar I, Rahbar Taromsari M. Evaluation of a PCR assay to detect Enterococcus faecalis in blood and determine glycopeptides resistance genes: van a and van B. Iran J Med Sci. 2012;37(3):194-9.

11.Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wolber J, Hellwig E, et al. Enterococcus faecalis from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. Front Microbiol. 2016; 6:1534.

12.Gulhan T, Boynukara B, Ciftci A, Sogut MU, Findik A. Characterization of Enterococcus faecalis isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. Iran J Vet Res. 2015;16(3):261-6.

13.Ferguson DM, Talavera GN, Hernández LA, Weisberg SB, Ambrose RF, Jay JA. Virulence Genes among Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolated from Coastal Beaches and Human and Nonhuman Sources in Southern California and Puerto Rico. J Pathog. 2016; 2016:3437214.

14.Bøhle LA, Riaz T, Egge-Jacobsen W, Skaugen M, Busk ØL, Eijsink VG, et al. Identification of surface proteins in Enterococcus faecalis V583. BMC Genomics. 2011;12(1):135.

15.Fallah F, Yousefi M, Pourmand MR, Hashemia A, Nazari Alam A, Afshar D. Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in Enterococci isolated from urinary tract infections. Microb Pathog. 2017; 108:85-90.

16.Arshadi M, Douraghi M, Shokoohizadeh L, Moosavian SM, Pourmand MR. High prevalence of diverse vancomycin resistance Enterococcus faecium isolates in clinical and environmental sources in ICU wards in southwest of Iran. Microb Pathog. 2017; 111:212-7.

17.Anbazhagan D, Mui WS, Mansor M, Yan GOS, Yusof MY, Sekaran SD. Development of conventional and real-time multiplex PCR assays for the detection of nosocomial pathogens. Braz J Microbiol. 2011;42(2):448-58.

18.Chang SS, Hsieh WH, Liu TS, Lee SH, Wang CH, Chou HC, et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis–a systemic review and meta-analysis. PLoS One. 2013;8(5): e62323.

19.E J, Jiang YT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of Enterococcus faecalis in the viable but nonculturable state. Genet Mol Res. 2015;14(4):14790-801.

20.Velasco D, Perez S, Pena F, Dominguez MA, Cartelle M, Molina F, et al. Lack of correlation between phenotypic techniques and PCR-based genotypic methods for identification of Enterococcus spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49(3):151-6

21.Nasaj M, Mousavi SM, Hosseini SM, Arabestani MR. Prevalence of Virulence Factors and Vancomycin-resistant Genes among Enterococcus faecalis and E. faecium Isolated from Clinical Specimens. Iran J Public Health. 2016;45(6):806-13.

22.Heidari H, Hasanpour S, Ebrahim-Saraie HS, Motamedifar M. High incidence of virulence factors among clinical enterococcus faecalis isolates in southwestern iran. Infect Chemother. 2017;49(1):51-6.

23.Sabzi S, Mashhadi R, Pourmand MR. Fibrinogen and mucin binding activity of EF0737, a novel protein of Enterococcus faecalis. Iran J Microbiol. 2017;9(6):324-30.