ORIGINAL ARTICLE

Validity of PCR for Diagnosis of Experimental Enterococcal Bacteremia in Rat

Hamidreza Honarmand[1],
Masomeh Falah Ghavidel[2],
Iraj Nikokar[3],
Morteza Rahbar taromsari[4],
Shervin Ghadarjani[5]

[1] Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[2] Department of Microbiology, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran
[3] Department of Microbiology, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[4] Department of Legal Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[5] School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

(Received November 21, 2010 ; Accepted January 5, 2013)

Abstract

Background and purpose: Bacteremia is one of the most common infective diseases. Rapid diagnosis of bacteremia might have great effect on the treatment of the disease and could result in a successful treatment by selecting effective antibiotics. Bacteremia due to *Enterococcus faecalis* is more common in hospitals and resistant strains are the main causes. Routine method using for diagnosis of bacteremia is a time consuming test so more rapid assays are preferred. The aim of this study was evaluating a PCR assay for rapid diagnosis of bacteremia in rat model which is similar to human bacteremia.

Materials and methods: To establish experimental bacteremia we used a standard strain to prepare a suspensions with 10^{8} cfu/ml bacteria for inoculating into 10 rats. Blood samples were taken from all rats after 24, 48, and 72 hours. PCR and routine assay was performed for all rats' specimens. Ten blood samples of healthy rats were used as control cases.

Results: Culture was positive for all specimens. Two specimens were found positive in PCR in the first day, seven samples in second day, and eight specimens in third day after inoculation. Culture and PCR assays were negative for all control samples. Sensitivity and specificity of PCR were 69.8% and 100%, respectively.

Conclusion: PCR is a more rapid assay than routine method for diagnosis of bacteremia and could be very effective in successful treatment. Therefore, it could be considered as an alternative method for culture but for increasing sensitivity of the test, we recommend using a more efficient DNA extraction method.

Keywords: Experimental bacteremia, *Enterococcus faecali*, PCR

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(97): 189-196 (Persian).

پژوهشی

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

ارزش PCR در تشخیص باکتریمی تجربی انتروکوکی در موش

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. باکتریمی ناشی از انتروکوک فکالیس بیشتر در بیمارستان‌ها شایع است و اغلب توسط سویه‌های مقاوم ایجاد می‌شود. تشخیص سریع باکتریمی کمک بزرگی به درمان این عارضه مهم می‌کند و انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر باکتری عامل بیماری را امکان پذیر می‌نماید. روش متعارف تشخیص باکتریمی بسیار وقت‌گیر است. هدف این مطالعه ارزیابی PCR در تشخیص سریع باکتریمی مدل رات است که به باکتریمی انسانی شباهت نزدیکی دارد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد- شاهدی، برای ایجاد باکتریمی تجربی، سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 cfu/ml به ۱۰ موش تلفیح شد. از تمام موش ها در فواصل ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح، نمونه خون گرفته شد. برای تمام نمونه خون‌ها روش‌های تشخیصی کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) انجام گردید. از نمونه خون ۱۰ موش تلقیح نشده به عنوان شاهد استفاده شد.

یافته‌ها: کشت نمونه خون گروه تلقیح شده مربوط به هر سه روز مثبت شد و به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد. در گروه تلقیح شده ، نتیجه PCR، ۲ نمونه خون مربوط به روز اول، ۷ نمونه روز دوم و ۸ نمونه روز سوم مثبت شدند. نتیجه روش کشت و PCR برای نمونه‌های شاهد همگی منفی بود. حساسیت این روش PCR حدود ۶۹/۸ و ویژگی آن ۱۰۰ درصد بوده است.

استنتاج: روش PCR در تشخیص باکتریمی انتروکوکی بسیار سریع‌تر از روش متعارف است و چون این سرعت در نتیجه درمان تأثیر بسیار زیادی دارد، می‌توان آن را یک تست جایگزین در نظر گرفت. 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 است و عامل مهم ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بوده 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، رشت، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۴. گروه پزشکی قانونی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۵. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۸۹/۸/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۰/۲/۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۱۰/۱۶

ادراری، و عفونت زخم‌ها می‌شود(۲،۱). باکتریمی، سپتی سمی و اندوکاردیت بیماری‌هایی هستند که به تشخیص سریع با شناسایی نوع باکتری در خون نیاز دارند و این امر در نتیجه درمان و عواقب بیماری تأثیر تعیین‌کننده‌ای دارد(۵- ۳). تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری نیز در موفقیت درمان نقش زیادی دارد(۶).

اغلب سویه‌های بیمارستانی به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند وانکومایسین مقاوم هستند(۷). انتقال باکتری در بیمارستان از چند طریق صورت می‌گیرد: ناقلین مدفوعی انتروکوک‌های مقاوم مانند پرسنل بیمارستان که با بیماران تماس نزدیک دارند، بیمارانی که به مدت طولانی بستری بودند، بیمارانی که آنتی‌بیوتیک به مدت طولانی دریافت کرده یا در بخش مراقبت های ویژه تحت نظر هستند(۷،۱). کشت متداول‌ترین روش تشخیص انتروکوک ها در خون است ولی چون برای درمان باکتریمی، سرعت تشخیص اهمیت بسیاری دارد، استفاده از روش‌های سریع ترجیح داده می‌شود(۲، 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 BEAA (بایل اسکولین آزید آگار) حاوی 6µg/ml وانکومایسن. این روش‌ها در مطالعات مختلف ارزیابی شده و حساسیت و ویژگی متفاوتی نشان دادند. با وجود این انجام آن‌ها و تأیید نهایی نتایج به ۲ تا ۳ روز وقت نیاز دارد(۱۱،۳،۲- ۹). همواره دستیابی به روش سریع‌تر، ساده‌تر، کم هزینه و مطمئن مد نظر بوده است و در این راستا روش‌های مولکولی به ویژه PCR در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه کنونی روش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی، برای تشخیص باکتریمی تجربی انتروکوک فکالیسی در موش 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. 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 شده بود(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 موش هم نژاد، هم جنس، هم سن و تقریباً هم وزن استفاده شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی ذکر شده به تمام موش ها تزریق شده و در فواصل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آن‌ها نمونه خون گرفته شد. برای تمام نمونه‌ها روش کشت و PCR انجام گردید. در ضمن برروی نمونه خون ۱۰ موش تلقیح نشده گروه شاهد نیز کشت و PCR انجام گردید.

به منظور غنی سازی اولیه، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه خون مورد آزمایش به یک میکروتیوب حاوی ml ۱/۵ محیط TSB انتقال داده شده و در دمای c ۳۵ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد سپس به محیط کشت TSA انتقال داده شد و در دمای c ۳۵ انکوباسیون صورت

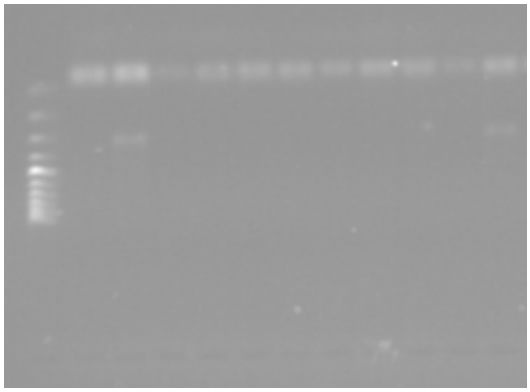
گرفت. پس از نمایان شدن کلنی‌ها، تمام تست‌های روتین ذکر شده انجام شد. برای استخراج DNA مقدار ۴۰۰ µl از هر نمونه مورد آزمایش به طور جداگانه به یک میکروتیوب ۲ ml انتقال داده و به آن ۱۶۰۰ µI آب مقطر استریل اضافه شد و به مدت یک ساعت در یخچال قرار داده شد تا خون به طور کامل لیز شود و بعد با دور۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌گردید. پس از دور ریختن محلول فوقانی، به رسوب حاصله پس از یک بار شستشو با PBS، I مقدار µ ۲۰۰ لیز بافر (مخصوص باکتری گرم مثبت) و µI ۱۰ لیزوزیم اضافه می‌شد و در درمای ^{o}C ۳۷ درانکوباتور به مدت یک ساعت قرار داده می‌شد. سپس µl ۲ پروتئیناز K (۱۸/۷ mg/ml) افزوده شده و در دمای ^{o}C ۵۶ 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 µl ۲۵ تهیه می‌شد: مقدار µl ۳ از x 10 PCR Buffer، µl ۲ از Mgcl2 (25mM)، µl ۰/۵ از dNTP، ۱۰۰ پیکو مول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم DNA pol و µl ۲ از DNA استخراج شده و افزودن آب مقطر تا حجم µl ۲۵. توالی پرایمرهایی که در این مطالعه استفاده شدند شامل:

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

برنامه PCR این گونه اجرا گردید: ۷ دقیقه دنا توراسیون اولیه با دمای ^{o}C ۹۴، تعداد ۳۴ سیکل شامل ۴۰ ثانیه دناتوراسیون با دمای ^{o}C ۹۴، ۴۰ ثانیه Anealing با دمای ^{o}C ۴۶ ، ۵۰ ثانیه Extension با دمای ^{o}C ۷۲ و در پایان ۱۵ دقیقه final extension با دمای ^{o}C ۷۲. 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 تصویربرداری انجام می‌شد.

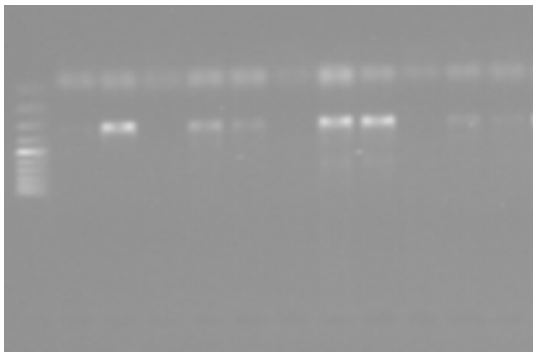
یافته‌ها

کشت تمام نمونه خون های گروه تلقیح شده مربوط به هر سه روز مثبت شد و به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد. در گروه مورد، نتیجه PCR، ۲ نمونه خون مربوط به روز اول، ۷ نمونه روز دوم و ۸ نمونه روز سوم مثبت شدند (تصاویر شماره ۳-۱). زمان اجرای کامل روش کشت ۴ روز و روش PCR حدود ۸ ساعت بود. در گروه شاهد، نمونه‌ها در هر دو روش منفی گزارش شدند. حساسیت این روش ۶۹/۸ و ویژگی آن ۱۰۰ درصد برآورد گردید.



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

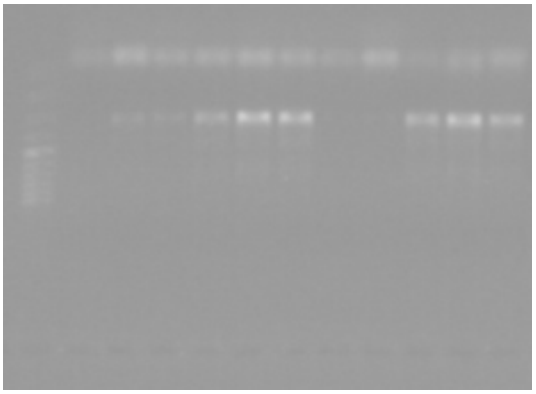
تصویر شماره ۱ : نتیجه PCR برای نمونه خون روز اول رات ها تلقیح شده با سویه ۱۲۳۷با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی گونه انتروکوک (ژن ریبوزومی 16S rRNA). ردیف L: لادر ۱۰۰bp. ردیف ۱: کنترل منفی. ردیف ۲ تا ۱۱ نمونه خون روز اول رات ها. باند اختصاصی ۳۲۰ bp در ردیف دوم و یازدهم مشاهده می‌شود.



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

گونـه انتروکـوک (ژن ریبـوزومی 16S rRNA). ردیـف 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. باند اختصاصی ۳۲۰ bp در ردیف دوم و سوم و چهارم، پنجم، ششم، نهم، دهم و یازدهم مشاهده می‌شود.

بحث

از آن جایی که روش متعارف وقت گیر است بنابراین برای تشخیص موارد باکتریمی، سپتی سمی و آندوکاردیت که باید هرچه سریع‌تر تشخیص داده شوند مناسب نیست و در غربالگری حاملین مدفوعی در موارد نظارت بیمارستانی که تعداد نمونه‌ها زیاد و تکرار دوره‌ای آزمایشات ضروری است، پر هزینه است. به همین دلیل همواره دستیابی به یک روش سریع‌تر،کم هزینه‌تر و مطمئن مد نظر بوده است.

شناسایی و تعیین هویت باکتری با کمک سیستم‌های تجاری API 20 و API 32 و آگار پلیت‌های تجاری مختلف در چند مطالعه ارزیابی شدند و حساسیت و ویژگی متفاوت نشان داده‌اند(۱۴-۱۲). محیط کشت‌های EVA و CNA-VGA و BEAA حاوی 6µg/ml وانکومایسن نیز در مطالعات مختلف ارزیابی شده‌اند(۱۲،۱۱،۳،۲). EVA در مقایسه با CNA-VGA کارآیی بهتری دارد زیرا بر روی CNA-VGA بعضی از باکتری‌های گرم منفی مخمرها هم رشد می‌کنند ولی مزیت آن در 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). به دلیل زمان زیاد روش متعارف، روش‌های تشخیصی مولکولی به ویژه PCR، می‌تواند جایگزین مناسبی باشند. در مطالعات مختلفی روش PCR جهت تشخیص جنس، گونه و تعیین ژن مقاومت دارویی انتروکوک ارزیابی شد و چند پرایمر نیز از توالی‌های ژن 16sr RNA و برخی ژن‌های دیگر، برای تشخیص جنس و گونه طراحی شده است(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 تشخیص باکتریمی می باشد، دشوار است. معمولاً حجم کمی از خون برای استخراج DNA استفاده می‌شود که تعداد باکتری در آن اندک است و تعداد زیاد سلول های قرمز، سفید، پروتئین ها و لیپوپروتئین ها که عامل مهارکننده PCR می باشند از جمله دشواری های این امر تلقی می شود(۱۸). برای برطرف کردن این مشکل Zhang و همکاران (۱۹۹۵) 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).

در مطالعه Newcomb و همکاران (۱۹۹۶) از روش Boom برای استخراج DNA باکتری نیسریا مننژیتیدیس از خون بیماران استفاده کردند(۲۱).

Klausegger و همکاران (۱۹۹۹) از بافر Zol DNA برای لیز کردن هم زمان باکتری‌ها و سلول‌های خونی استفاده نمودند(۲۲) Anthony و

همکاران (۲۰۰۰) 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.

مطالعات مختلفی توسط محققان از جمله Stake، Dutka –Malen، jayartne، ... و همکارانشان برروی ایزوله های بالینی صورت گرفت(۱۹- ۱۶، ۲۵، ۲۶). و مطالعات Ke و همکاران(۲۷)، Kariyama و همکاران(۲۸) بر روی سویه‌های استاندارد انجام شد. Stake و همکاران برای افزودن حساسیت PCR، غنی‌سازی و افزایش جمعیت اولیه انتروکوک‌ها، نمونه مدفوع را به کار 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 و Paule و همکاران نیز روش تشخیص مولکولی حساس‌تر از کشت اعلام گردید(۲۵، ۲۶). در مطالعه کنونی حساسیت کشت بیشتر بود و به نظر 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 معایب 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 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. در مطالعه Ke و همکاران در سال ۱۹۹۹ پرایمرهای انتروکوکی استفاده شده، دو گونه باکتری دیگر از جنس آبیوتروفیا و چهار گونه از جنس لیستریا را نیز فرا گرفت ولی با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی‌تر این مشکل را می‌توان برطرف نمود(۲۷). در مطالعه کنونی از پرایمرهای طراحی شده توسط Kariyama استفاده شد و مشکل مزبور مطرح نبود(۲۸). اگر پرایمرها طوری باشند که انتروکوک را فقط در حد جنس شناسایی کنند، برای شناسایی در حد گونه، باید اقدامات دیگری از قبیل RFLP بر روی محصولPCR انجام داد مانند روش مطالعه Patel و همکاران در سال ۲۰۰۳ (۲۶). استفاده از پرایمر اختصاصی گونه، روش دیگری است که در مطالعه کنونی نیز انجام شده است.

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 دلیل 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 بیش تری دارد و چون تفاوت زمانی آن با PCR متعارف خیلی زیاد نیست چندان توصیه نمی‌شود. شایان ذکر است که در عرصه کشت و روش‌های سنتی 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 و انکومایسین می‌شود بنابراین با قدرت تفکیکی بالا، فقط گونه‌های مقاوم 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 رقیق نمود، 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 قدردانی 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(1): 41-46.
4. Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. 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(7): 888-908.
6. Vincent JL, Abraham L. The last 100 years of sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173(3): 256-263.
7. Westh H, Lisby G, Breysse F, Böddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. Clin Microbiol Infect 2009; 15(6): 544-551.
8. Devriese LA, Pot B, Collins P MD. Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenitically distinct enterococcal species and species group. J Appl Bacteriol 1993; 75(3): 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(5): 366-369.
10. Sahm DF, Free L, Smith C, Eveland M, Mandy LM. Rapid characterization schems for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1997; 38(8): 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(4): 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(7): 695-696.
14. Sader HS, Biedenbach D, Jones RN. Evaluation of Vitek and API20s for species identification of enterococci. Diag Microbiol Infect Dis 1995; 22(4): 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(3): 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 relivant genotypes of vancomycin-resistent enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. J Clin Microbiol 1999; 37(6): 2090-2092.
19. Shang S, Chen G, Wu Y, DU L, Zhao Z. Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA gene. Pediatr Res 2005; 58(1): 143-148.
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(3): 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(7): 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; 37(2): 464-466.
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(11): 1677-1681.
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; 39(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 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.