Archive of SID

Molecular Identification of Epsilon Toxin-Producing *Clostridium perfringens* in Stool Samples in Patients with Multiple Sclerosis

Asgharzadeh S[1], Amini K[2]

Abstract

Purpose: Multiple Sclerosis is a vascular disease in the central nervous system. There is evidence that *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes damage to the myelin of the neuronal cells by increasing the permeability of the blood-brain barrier, and therefore contributes to the disease. Therefore, the aim of this study was the molecular identification of *C. perfringens* Epsilon toxin in samples isolated from multiple sclerosis patients using multiplex-PCR.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, 60 stool samples of patients with multiple sclerosis and 60 specimens of healthy individuals were studied. ε-toxin producing *C. perfringens* infection was examined by the M-PCR method after genomic DNA extraction.

Results: of 60 fecal specimens obtained from patients with multiple sclerosis, 11 (18.3%) and 2 (3.3%) samples were positive for 16S rRNA and ε-toxin-encoding gene, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that the prevalence of *C. perfringens* toxigenic strains in MS patients are higher than in the control group, which can indicate the association between the presence of this toxin and MS disease.

Keywords: Multiple sclerosis, *Clostridium perfringens*, ε-toxin, Multiplex-PCR

Received: 2018.05.19 Accepted: 2019.04.18

بررسی مولکولی کلونیزاسیون *Clostridium perfringens* تولیدکننده سم اپسیلون در نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلابه مالتیپل اسکلروزیس

سارا اصغرزاده[۱]، کیومرث امینی[۲]

هدف: مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی است. شواهدی وجود دارد که سم اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس با افزایش نفوذپذیری سد خونی-مغزی باعث آسیب به میلین سلول های عصبی می‌شود و لذا در بروز این بیماری نقش دارد. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه، شناسایی مولکولی کلستریدیوم پرفرنجنس تولیدکننده سم اپسیلون در نمونه های جدا شده از مدفوع بیماران مولتیپل اسکلروزیس به روش Multiplex-PCR می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-مقطعی که بر روی ۶۰ نمونه مدفوع بیماران مبتلابه مولتیپل اسکلروزیس و ۶۰ نمونه مدفوع افراد سالم صورت گرفت، آلودگی به کلستریدیوم پرفرنجنس مولد ε-توکسین توسط روش M-PCR پس از استخراج DNA ژنومی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از تعداد ۶۰ نمونه مدفوعی دریافت شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس تعداد ۱۱ نمونه (۱۸/۳٪) برای 16S rRNA و ۲ نمونه (۳/۳٪) برای ژن کد کننده ε-توکسین مثبت بودند. تمامی نمونه های حاصل از افراد سالم فاقد کلستریدیوم پرفرنجنس و سم اپسیلون بودند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، فراوانی سویه های کلستریدیوم پرفرنجنس توکسیژنیک در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس بالا است که این خود می تواند بیانگر ارتباط بین وجود این توکسین و بیماری مالتیپل اسکلروزیس باشد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، کلستریدیوم پرفرنجنس، ε-توکسین، Multiplex-PCR

نویسنده مسئول: کیومرث امینی، dr_kumarss_amini@yahoo.com، ORCID: 0000-0002-6419-3417

www.SID.ir

Archive of SID

آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
۱- کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس نوعی بیماری مزمن دستگاه اعصاب مرکزی است که با التهاب و از بین رفتن غلاف چربی پوشاننده اعصاب بدن که میلین نامیده می‌شود، همراه است (۱). این تخریب زمانی اتفاق می‌افتد که بخشی از گلبول های سفید خون از سد خونی-مغزی (Blood–Brain Barrier)[1]عبور کرده و به سیستم اعصاب مرکزی وارد شوند و غلاف میلین سلول های عصبی را به عنوان عوامل بیگانه شناسایی کنند (۵، ۲). این یک بیماری چند عاملی است و اتیولوژی دقیق این بیماری مشخص نیست ولی فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در مستعد کردن افراد به بیماری نقش دارند (۷، ۶). نقش عفونت های مختلف از قبیل عفونت‌های ویروسی و باکتریایی در ایجاد این بیماری در شرایط اپیدمیولوژیک مختلف بررسی شده و در هر منطقه، ارتباط این عفونت‌ها با مالتیپل اسکلروزیس مشخص شده است (۹، ۸). محققان از شواهد به عمل آمده دریافتند که بیماری مالتیپل اسکلروزیس ممکن است از طریق سم تولید شده از باکتری های و یا ایمونوپاتوژنز آن ها در ارتباط باشد. شواهدی وجود دارد که سم اپسیلون کلستریدیوم[2] پرفرنجنس با افزایش نفوذپذیری BBB باعث آسیب به میلین سلول های عصبی می‌شود (۵).

کلستریدیوم پرفرنجنس بر اساس توانایی تولید ۴ نوع توکسین اصلی به نامهای آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به ۵ تیپ E تا A طبقه بندی می‌شوند (۶). جایگاه هر کدام از این ژن های مولد توکسین و نحوه عملکرد آن ها در سلول متفاوت می باشد. برخی ژن های مولد توکسین مثل ژن آلفا توکسین، *plc* و یا *cpa*، بر روی کروموزوم قرار دارند در حالی برخی دیگر مثل ژن های توکسین بتا *cpb* ویا اپسیلون *etx* بر روی پلاسمید واقع شده اند. ژن انتروتوکسین *cpe* می تواند هم بر روی کروموزوم و هم بر روی پلاسمید قرار گیرد. به غیر از توکسین یوتا که از طریق فعال کردن واکنش های داخل سلولی اثرات خود را می گذارد بقیه توکسین ها از طریق تاثیر بر غشاهای سلولی نقش خود را ایفا می نمایند (۱۰). تیپ A فقط توانایی تولید آلفا توکسین را دارد؛ درحالی‌که تیپ B توکسین های آلفا، بتا و اپسیلون را تولید می‌کند. تیپ C توانایی تولید توکسین های آلفا و بتا، تیپ D آلفا و اپسیلون و تیپ E نیز توکسین های آلفا و یوتا را تولید می‌کند. جذب سموم از طریق مخاط روده صورت گرفته و به سرعت در تمام اندام ها پخش می شود که عامل القای افزایش فشارخون و آب آوردگی در اندام های مختلف می گردد. Etx باعث مرگ سلولی سریع در سلول های خاصی که گیرنده لازم را دارند می شود. ژن کد کننده توکسین اپسیلون بر روی پلاسمید قرارداد و یک پروتوکسین است که پس از مجاورت با آنزیم های گوارشی به ویژه تریپسین پپتید N- ترمینال و C- ترمینال خود را از دست می دهد به توکسین فعال شده ناپایدار تبدیل می شود (۷). پروتئین فعال شده بسیار سمی است و اثرات کشنده آن، نکروز پوستی و فعال کننده التهاب می باشد. همچنین، این سم می تواند از طریق خون به سلول های مغز برسد و موجب مالتیپل اسکلروزیس شود (۳، ۱). بنابراین مطالعات بیشتر در زمینه ارتباط توکسین های این باکتری و مالتیپل اسکلروزیس حائز اهمیت می باشد. لذا، هدف از این مطالعه بررسی بررسی مولکولی کلونیزاسیون تیپ B تولیدکننده سم اپسیلون در نمونه-های مدفوع بیماران مبتلابه مالتیپل اسکلروزیس می باشد (۳).

روش بررسی

این مطالعه توصیفی _مقطعی، از فروردین ۱۳۹۵ لغایت مهر سال ۱۳۹۶ تعداد ۶۰ نمونه مدفوع از افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و ۶۰ نمونه مدفوع از افراد سالم (گروه کنترل) مراجعه‌کننده به بیمارستان سینا (تهران) جمع‌آوری گردید. سم اپسیلون ناشی از کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ B و تیپ D تولید شده که از قوی ترین سموم کلستریدیال بوده که در رتبه بعدی پس از بوتولینوم و تتانوس می باشد (۹). جذب سموم از طریق مخاط روده صورت گرفته و به سرعت

[1] *Epsilon toxin Clostridium perfringens* Epsilon Toxin (ETX)

[2] *Clostridium Perfringens*

www.SID.ir

Archive of SID

در تمام اندام ها پخش می شود که عامل القای افزایش فشارخون و آب آوردگی در اندام های مختلف می گردد (۱۶، ۱۵).

حجم نمونه با استفاده از روش محاسبه کوکران $n=Z^2(p)\times(1-p)/C^2$ تعیین گردید (۱۲-۶). در این فرمول Z همان شاخص Z (۱/۹۶ برای سطح اطمینان ۹۵٪)، p درصد که برابر با ۰/۵ در نظر گرفته شد و C همان کران خطا است که برابر با ۰/۱۳۵ در نظر گرفته شد (۱۷، ۱۵). حجم نمونه برابر با ۵۳ مورد برای هر گروه در نظر گرفته گردید که با در نظر گرفتن ۱۵٪ ریزش نمونه در مطالعه حجم نمونه نهایی برای هر گروه برابر ۶۰ مورد در نظر گرفته شد (۸). وجود بیماری مالتیپل اسکلروزیس در بیماران توسط پزشک متخصص بیماری های مغز و اعصاب تائید شد. در تمامی افراد گروه کنترل هیچ نشانه ای از بیماری نورولوژیک یافت نشد (۱۶).

به منظور تکثیر ژن های هدف (*etx* و 16srna)، ابتدا DNA ژنومی سویه ها با استفاده از کیت CinnaPure-DNA Positive Bacteria (سینا کلون، ایران) استخراج گردید (۱۴، ۱۳). جهت تائید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. توالی الیگونوکلئوتیدی از پرایمر موجود در جدول ۱ آورده شده است (۱۵، ۷). پس از BLAST پرایمرهای انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۵/۵ میکرو لیتر PCR Master Mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی Taq DNA Polymerase (0.05 U/µl)، MgCl2 (3 mM) و dNTPs (0.4mM)، ۱ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ Nano Gram) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ (۱۸، ۴) با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت Denaturation ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر Annealing ۵۶ درجه برای ۳۰ ثانیه، گام سوم بسط Extension اولیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد (جدول۱). در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) الکتروفورز گردید.

اطلاعات پس از جمع آوری در دو گروه به وسیله نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ تجزیه و تحلیل و مقادیر با استفاده از فراوانی و درصد در هر گروه گزارش گردید.

یافته‌ها

۶۰ نمونه مدفوع از بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس (شامل ۴۱ نمونه (۶۸/۴٪) از جنس مؤنث و ۱۹ نمونه (۳۱/۶٪) از جنس مذکر) و تعداد ۶۰ نمونه از افراد سالم (۳۲ نمونه (۵۳/۴٪) مدفوع از جنس مؤنث و ۲۸ نمونه (۴۶/۶٪) از افراد مذکر) جمع آوری شدند. دامنه ی سنی بیماران ۷۳-۳۲ سال با میانگین ۱/۳۴±۴۶ سال بود. در این مطالعه تعداد ۱۱ نمونه (۱۸/۳٪) کلستریدیوم پرفرنجنس برای ژن 16S rRNA مثبت در نظر گرفته شد. از میان تمامی سویه های کلستریدیوم پرفرنجنس شناسایی شده، ۲ نمونه (۱۸/۲٪) حاوی ژن کد کننده توکسین اپسیلون بودند (شکل ۱). در تمامی۶۰ نمونه مدفوع به دست آمده از افراد گروه کنترل (سالم)، کلستریدیوم پرفرنجنس و توکسین اپسیلون وجود نداشت. دراین مطالعه سویه کلستریدیوم پرفرنجنس حامل توکسین اپسیلون ATCC 13124 خریداری شده از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه از میان تمامی ۶۰ نمونه مدفوع به دست آمده از افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس تعداد ۱۱ مورد (۱۸/۳٪) به کلستریدیوم پرفرنجنس دیده شد. همچنین فراوانی ژن کد کننده توکسین اپسیلون در این نمونه ها برابر ۳/۳٪ بود.

طبق تحقیقات اختلالات روده ای خسته کننده، تلف-کننده وقت و تجربه ای خجالت آور برای بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس است. Zorzon و همکارانش (۲۱) در مطالعه ای اختلالات جنسی را در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس بررسی کرده اند. این محققین دریافتند که اختلالات جنسی بشدت کیفیت زندگی مبتلایان به مولتیپل اسکلروزیس را تحت تأثیر قرار

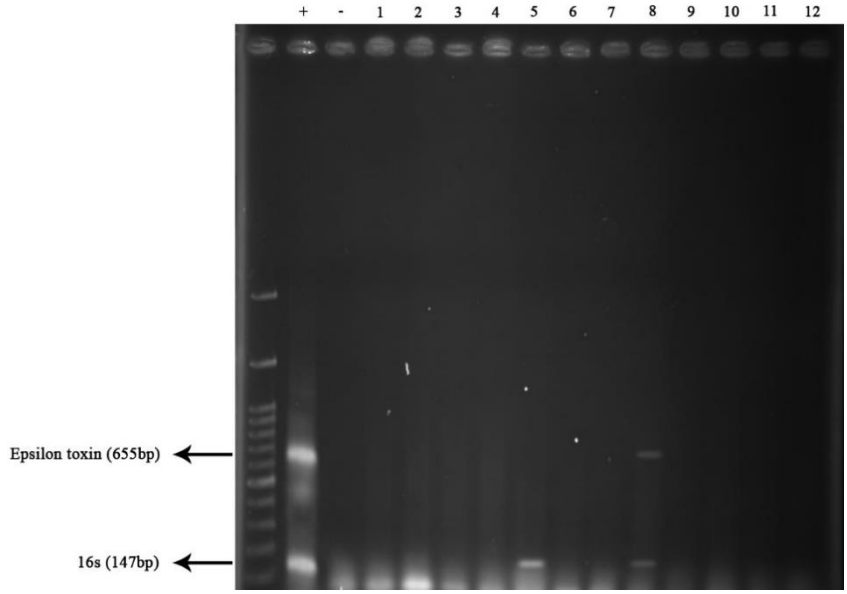
[3] Confidence Level

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: توالی پرایمری استفاده شده در این تحقیق به عنوان پرایمر (۴)

ژن	توالی آغازگر (′3→′5)	طول قطعه (جفت باز)
16s rRNA	F=5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3 ' R=5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3'	۱۴۷
etx	F=5'-GCGGTGATATCCATCTATTC-3' R=5'-CCACTTACTTGTCCTACTAAC-3'	۶۵۵



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. DNA سایز مارکر؛ ۱۰۰bp، کنترل منفی؛ آب مقطر و کنترل مثبت، کلستریدیوم پرفرنجنس حامل توکسین اپسیلون ATCC 13124

می‌دهد. در مطالعه دیگری که تحت عنوان ارتباط بین اختلالات خواب و خستگی در بیماران مبتلا بـه مولتیپل اسکلـروزیس توسط Attarian (۲۲) انجـام گردیده اسـت. در مطالـعه ای کـه توسـط Donnell و Hawkins (۲۳) بـر روی ناتوانی ۳۸۸ بیمار انجام گرفته است. Brunham و Tremleet (۲۴) در مطالـعه‌ای ارتبـاط بین حـس، حـرکت و قدرت عضلانـی انـدام تحتانـی را ارزیابـی کرده اسـت و چنیـن نتیجه‌گیـری مـی‌کند که ارتبـاط معنی‌داری بیـن وضعیـت حسـی بدن و تعـادل وجود نـدارد در حالی که ارتباط بین حرکت و توانایی کنترل بدن هنگام حرکت و قدرت عضلانی اندام تحتانی معنی دار مـی باشد. Klewer و همکارانش (۲۵) در مطالـعه ای مشکـلات افراد مبتـلا به مولتیپل اسکلروزیس را بررسی کردند که در یک نمونـه ۱۹۲۶ نفری تحـت مطالعه ۴۴ درصـد از فلج و ۴۲ درصد از ضعف و اختـلال حس رنج مـی‌برند. استیک (۲۶) بیان می‌کند که مولتیپل اسکلـروزیس اغلب در شکستن پیوند زناشویـی نقش دارد، خصوصاً اگر پایه ارتباط ضعیف باشد. Rumah و همکاران (۷) در آمریکا توکسین اپسیلون مترشحه از تایپ B کلستریدیوم پرفرنجنس را از مدفوع بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس جدا نمودند و این اولین مورد جداسازی این تایپ از کلستریدیوم پرفرنجنس از انسان بود. Wagley و همکاران (۱۶) با استفاده از Western blotting نشان دادندکه ۲۴٪ سرم در گروه های CDمالتیپل اسکلروزیس Clinically Definite Multiple Sclerosis، CIS Clinically isolated syndrome و ON Optic neuritis (۱۲۵نفر) با Etx واکنش نشان دادند. Miyamoto و همکاران (۱۷) در مطالعه ای تحت عنوان توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس باعث انتشار بیش از حد گلوتامات در هیپوکامپ موش دریافتند که هم تشنج و هم ترشح گلوتامات با تزریق ریولوزول، مهارکننده آزادسازی گلوتامات از پیش سیناپس، کاهش یافتند، که نشان می‌دهد که این سم در افزایش جریان گلوتامات، منجر به تشنج و عوارض نورونی

www.SID.ir

Archive of SID

هیپوکامپ می‌شود. Vartanian و همکاران (۱۸) فراوانی کلستریدیوم پرفرنجنس و ژن سم اپسیلون را در نمونه های غذاهای افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس موردبررسی قراردادند و دریافتند که از ۳۷ نمونه مواد غذایی، ۱۳/۵٪ برای حضور باکتری و ۲/۷٪ برای ژن سم اپسیلون مثبت بود.

مطالعات اندکی در زمینه ی ارتباط توکسین های این باکتری با این بیماری در جهان انجام شده و در ایران این مطالعه برای اولین بار انجام می‌گردد، که تحقیقات بیشتر می تواند اطلاعات تکمیل تری را در این زمینه در اختیار پژوهشگران قرار دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، فراوانی سویه های توکسیژنیک کلستریدیوم پرفرنجنس در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس بالا است که این می‌تواند احتمالا" ارتباط بین وجود این توکسین و ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه کارکنان بیمارستان سینا، همکاری تمام بیماران و افراد سالم شرکت کننده در این پروژه، پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی-میکروبی پاسارگاد (واقع در تهران) و دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2018; 8(3): a028936.
2. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung H-P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Nature Reviews Neuroscience 2002; 3(4): 291-301.
3. Serafini B, Zandee S, Rosicarelli B, Scorsi E, et al. Epstein-Barr virus-associated immune reconstitution inflammatory syndrome as possible cause of fulminant multiple sclerosis relapse after natalizumab interruption. Journal of neuroimmunology 2018; 15; 9-12.
4. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. New England Journal of Medicine 2006; 354(9): 942-55.
5. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. The Journal of experimental medicine 2004; 199(7): 971-979.
6. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Immunologic research 2002; 25(1): 27-51.
7. Rumah KR, Linden J, Fischetti VA, Vartanian T. Isolation of Clostridium perfringens type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. PLoS One 2013; 8(10): e76359.
8. Nourbakhsh B, Graves J, Casper TC, Lulu S, et al. Dietary salt intake and time to relapse in paediatric multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2016; 87(12): 1350-3.
9. O'connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. Journal of clinical immunology 2001; 21(2): 81-92.
10. Földes A, Kádár K, Kerémi B, Gyires K, et al. Mesenchymal stem cells of dental origin-their potential for antiinflammatory and regenerative actions in brain and gut damage. Current

www.SID.ir

Archive of SID

neuropharmacology 2016; 14(8): 914-934.

11. Segal BM, Cohen JA, Antel J. Americas Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis Forum 2017: Environmental factors, genetics, and epigenetics in MS susceptibility and clinical course. Multiple Sclerosis Journal 2018; 24(1): 4-5.

12. Nasserinejad M, Pourhoseingholi MA, Rezasoltani S, Akbari S, et al. Single-nucleotide polymorphism of Exo1 gene is associated with risk of colorectal cancer based on Robust Bayesian approach. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench. 2018; 11(Suppl 1): S146-S148.

13. Hussain K, Ijaz M, Durrani A, Anjum A, , et al. Bacterial count and predisposing factors of Clostridium perfringens (targeting CPA gene) infection along with antimicrobial sensitivity in diarrheic sheep in Pakistan. Tropical Biomedicine 2018; 35(2): 434-441.

14. Linden JR, Ma Y, Zhao B, Harris JM, et al. Clostridium perfringens epsilon toxin causes selective death of mature oligodendrocytes and central nervous system demyelination. MBio 2015; 6(3): e02513-2514.

15. Uzal FA, Songer JG. Diagnosis of Clostridium perfringens intestinal infections in sheep and goats. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2008; 20(3): 253-65.

16. Wagley S, Bokori-Brown M, Morcrette H, Malaspina A, et al. Evidence of Clostridium perfringens epsilon toxin associated with multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2018 :1352458518767327.

17. Miyamoto O, Sumitani K, Nakamura T, Yamagami SI, et al. Clostridium perfringens epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. FEMS microbiology letters 2000; 189(1): 109-113.

18. Vartanian T, Rumah K, Linden J. Identification of Clostridium Perfringens Epsilon Toxin As A Candidate Trigger For New Lesion Formation In Multiple Sclerosis (P6. 151). Neurology 2014; 82(10 Supplement): P6-151.

19. Ebringer A, Hughes L, Rashid T, Wilson C. Acinetobacter immune responses in multiple sclerosis: etiopathogenetic role and its possible use as a diagnostic marker. Archives of neurology 2005; 62(1): 33-6

20. .Samedly lii J, Fisher D, Smedley Sayeed S, Chakrabarti G, McClane B. The enteric toxins of Clostridium perfringens. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology: Springer: 2004; 183-204

21. Zorzon M, Zivadinov R, Bragadin LM, Moretti R, et al. Sexual dysfunction in multiple sclerosis: a 2-year follow-up study. Journal of the neurological sciences 2001; 187(1): 1-5.

22. Attarian HP, Brown KM, Duntley SP, Carter JD, Cross AH. The relationship of sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. Archives of neurology 2004; 61(4): 525-8.

23. Mc Donnell G, Hawkins S. An assessment of the spectrum of disability and handicap in multiple sclerosis: a population-based study. Multiple sclerosis 2001;7(2): 111-117.

24. Brunham S, Tremleet H. Assessing Balance in MS: Relationship between motor control and sensory integration. International Journal of MS care 2002; 6: 83.

25. Klewer J, Pöhlau D, Nippert I, Haas J, Kugler J. Problems reported by elderly patients with multiple sclerosis. Journal of Neuroscience Nursing 2001; 33(3): 167-71.

26. Steck B. The psychosocial impact of multiple sclerosis on families and children. International MS Journal. 2000; 7(2): 62.

www.SID.ir