Archive of SID

تحقیقی

مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان/ دوره ۲۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ۲۹۴-۲۹۸

بررسی آلودگی لژیونلا پنومونیا ، سودوموناس آئروژنزا و کوکوس‌های گرم مثبت در سیستم آبی دستگاههای جرم‌گیری مطبهای خصوصی اصفهان

دکتر پریچهر غلیانی[۱]- مجید کرمی[۲]- دکتر سید اصغر هوایی[۳]- دکتر علی اصغر نادری[۴]- دکتر میلاد علیخانی[۴]

۱- دانشیار مرکز تحقیقات ترابی نژاد، گروه آموزشی بیماریهای دهان، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- لیسانس پرستاری، کارشناس نظارت بر درمان ناحیه لنجان

۳-دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دستیار تخصصی کمیته پژوهشهای دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: *پرسنل دندانپزشکی با آب و آیروسل‌های تولید شده توسط یونیت مواجهند. آبی که وارد یونیت‌های دندانپزشکی می‌شود معمولاً تعداد اندکی میکروب دارد اما آب خروجی بیش از یکصد هزار میکرو ارگانیسم در هر میلی‌لیتر دارد. میکروارگانیسم‌های مختلفی در بیوفیلم سیستم آب یونیت‌ها یافت می‌شوند و از این میان انواع لژیونلا، سودوموناس و کوکسی‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. یکی از فعالیتهایی که خطر آلودگی باکتریایی زیادی دارد جرم‌گیری و تسطیح سطح ریشه است. هدف از این مطالعه بررسی آلودگی لژیونلا پنومونیا، سودوموناس آئروژنزا و کوکوس‌های گرم مثبت در سیستم آبی دستگاههای جرم‌گیری مطبهای خصوصی اصفهان می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی از پنجاه مطب نمونه‌گیری به عمل آمد. از هر یونیت ده میلی‌لیتر نمونه از دستگاه جرم‌گیر گرفته شد. در ادامه نمونه‌ای نیز از آب شهری هم جهت کنترل گرفته شد. جهت بررسی وجود لژیونلا از روش 3step PCR استفاده گردید. DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری بر اساس وجود توالی ژن mip بررسی شد. برای بررسی وجود سودوموناس نیز نمونه‌ها در محیط برگینت گرین لاکتوز بایل براث کشت داده شدند و نمونه‌های رشد کرده جهت تأیید وجود سودوموناس در محیط سیتریمیت آگار کشت داده شدند که با تست اکسیداز نیز تأیید گردیدند. جهت بررسی وجود کوکوس‌های گرم مثبت نیز ابتدا چندین اسمیر تهیه و پس از رنگ آمیزی گرم، نمونه‌های گرم مثبت را روی محیط کشت Blood agar کشت داده شد. سپس داده‌ها با نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج در قالب جداول، نمودار و بر حسب تعداد و درصد با استفاده از آمار توصیفی ارائه گردید.*

یافته‌ها: *از پنجاه مطب دندانپزشکی مورد بررسی هیچ یک از نمونه‌های کنترل از آب شهری رشد نکردند. ۳۲ مورد از نمونه‌های تست نیز از نظر سه کونه باکتری لژیونلا پنومونیه، کوکسی‌های گرم مثبت و سودوموناس آئروژنز منفی بودند، اما در ۱۸ مطب نتایج تست این سه باکتری مثبت شد.*

نتیجه‌گیری: *بر اساس این یافته‌ها خطر حضور باکتری‌های خطرناکی در بیوفیلم یونیت‌ها هست و باید روی سلامت آب مورد استفاده در اعمال دندانپزشکی دقت ویژه‌ای شود.*

کلید واژه‌ها: *لژیونلا ، سودوموناس آئروژنزا ، کوکسی گرم مثبت ، سیستم آبی یونیت‌های دندانپزشکی*

وصول مقاله: ۱۳۹۳/۲/۱ اصلاح نهایی: ۱۳۹۳/۹/۵ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۹/۱۶

نویسنده مسئول: دکتر میلاد علیخانی، دستیار تخصصی کمیته پژوهشهای دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

e.mail:alikhanimilad.oralmedicine@yahoo.com

مقدمه

از آنجا که بیماران و پرسنل دندانپزشکی معمولاً با آب و آیروسل‌های تولید شده توسط یونیت مواجهند بنابراین بررسی میکروبی این آب بسیار مهم است. (۱)، آبی که وارد یونیت‌های دندانپزشکی می‌شود معمولاً تعداد اندکی میکروب دارد (ده الی صد در هر میلی‌لیتر). اما آبی که از محل هندپیس پوار هوا یا جرم‌گیر خارج می‌شود بیش از یکصد هزار

www.SID.ir

Archive of SID

میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر به همراه دارد. این آلودگی از بیوفیلم متصل به سطح داخلی لوله‌ها منشأ می‌گیـرد. (۲)، در مجموع میکـروارگانیسم‌هـای مختلفـی در آب یونیت‌ها یافت می‌شونـد و از این میـان انـواع پاتـوژن به خصوص سودوموناس، کوکسی‌ها، لژیونلا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. (۳)، دندانپزشکان دارای شیوع بالاتری از لژیونلا پنوموفیه نسبت به افراد معمول جامعه هستند و یک منشأ مهم برای این شیوع بالاتر آیروسل‌هـاست که در جریان عملیـات جرم‌گیری به میزان زیادی تولید می‌گردند. (۴-۵)

سودوموناس آئروژنزا هم یکی از عوامل عفونتهای ریوی است که از منابع مهم انتقال آن آیروسل‌های دندانپزشکی است به ویژه در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروز و افراد با زمینه نقص در سیستم ایمنی. (۶-۷)، به علاوه کوکسی‌ها که در عفونتهای لثه نقش مهمی دارند در آب یونیت‌ها مشاهده شده‌اند. (۸)، منشأ همه این باکتری‌ها بیوفیلم موجود در سیستم لوله‌کشی یونیت‌هاست. بیوفیلم یک توده میکروبی هتروژن پیچیده است که در هر سطح مرطوب غیراستریل ایجاد می‌شود. (۹)، علاوه بر این فلور میکروبی دهان بیماران هم می‌تواند به واسطه اثر مکش و برگشت بزاق بیمار از راه ساکشن یا مجرای سر توربین امکان ورود به سیستم آبرسانی یونیت را داشته باشد چنـان که Anderson در سال ۱۹۹۹ آلـودگی برگشتـی از مجرای سر تـوربین‌ها را پانصد هزار CFU/ML گزارش کرد. (۱۰)

Pankhurst نیز در سال ۲۰۰۴ گـزارش کـرد ممکن است باکتری‌ها و ویروس‌ها از حفره دهان به داخل هندپیس‌های دندانپزشکی آسپیره شوند و آن را آلوده کنند که طبعاً این آب آلوده وارد مجاری آب جرم‌گیرها هم می‌شود و بیماران دیگر یا دندانپزشک را در خطر قرارمی‌دهند. (۱۱)، یکی از فعالیتهای تروماتیک دندانپزشکی که خطر آلودگی باکتریایی زیادی دارد جرم‌گیـری و تسطیح سطح ریشه است. چنان که مطالعـات متعددی از جمله مطالعه Maki و همکاران باکتریمی پس از این اعمال را گـزارش کردنـد. (۱۲)، با توجه به این حقیقت که جرم‌گیر و دستگاه برساژ دارای آیروسل‌های فراوانی هنگام کار می‌باشنـد که دنـدانپـزشکان و پرسنل و بیمار را تحت پوشش قـرار می‌دهنـد و آب خروجـی از آن نیز در تماس مستقیم با لثه‌هاست که اکثراً به هنگام عمل جرم‌گیری دارای زخم و خونریزی هستند، این اعمال می‌توانند در بیماران یا دندانپزشکان مسن و یا دارای زمینه ضعف سیستم ایمنی ایجاد بیماریهای عفونی کنند. (۹)، از اینرو هدف از این مطالعه تعیین آلودگی لژیونلا، پنوموفیلا، سودوموناس، آئروژنزا و کوکوس‌های گرم مثبت در سیستم آبی دستگاههای جرم‌گیری مطبهای خصوصی اصفهان می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعـه تـوصیفی - مقطعی بر اساس نتـایج معنـادار مطالعه Pouralibaba (۱۳) در سطح p=۰/۰۵ از پنجاه مطب دندانپزشکی مایل به همکاری در منطقه از همه یونیت‌های فعال دارای جرم‌گیـر نمونـه‌گیـری به عمل آمد و نمونـه‌گیـری به صورت سرشماری انجام شد. برای فرصت تشکیل بیوفیلم نمونـه‌گیـری پس از حداقل ۲۴ ساعت تعطیلی مطب صورت گرفت. مشکل سیستم فلاشینگ یونیت، تعمیر، شستشو و ضدعفونی کردن اخیر سیستم آب یونیت‌ها در این مطالعه از معیارهای خروج از مطالعه بودند و هیچ کدام از مطبها از منبع آب جداگانه استفاده نمی‌کردند. ضوابط بیانیه هلسینگی برای مدیران مطبها رعایت شد. (۱۴)، از هر یونیت نمونه‌ای در حجم ده میلی‌لیتر از سر دستگاه جرم‌گیر گرفته شد. یک نمونه نیز از آب شهری مطب قبل ورود به یـونیت‌ها جهت کنتـرل و مقایسه گرفته شد. نمونه‌ها را در لوله‌های یک بار مصرف مدرج ریخته و بلافاصله درب آنها بسته و در یک ظرف حاوی یخ نگه داشتـه و سریعاً به آزمایشگاه میکروبیـولوژی انتقال داده شدند.

جهت بررسی وجود لژیونلا از روش PCR استفاده گردید. (۱۵)، بدین روش که در دمای استانـدارد (۲-۸ درجـه سانتی گراد) به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه منتقل شدند و DNA همان روز استخراج گردید. استخراج با روش پروتئیناز K و رسوب با نمک صورت گرفت. (با چند بار سانتیفوژ کردن در ده هزار دور و با کمک بافرهای TES,PBS و پروتئیناز K) پس از ظهور رشته‌های DNA و شستشو با اتانول ۷۰٪، مجدد

www.SID.ir

Archive of SID

در دور ده هزار سانتریفوژ شد و بیست میکرولیتر بافر TE به DNA اضافه و PCR شروع شد. DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری بر اساس وجود توالی ژن mip صورت گرفت. (۱۶)، PCR به روش 3Step انجام گردید. به این شکل که چهل بار سه مرحله دناتوراسیون تکرار شد.

دناتوراسیون اولیه پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد سپس Annealing ثانیه در ۶۲ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً Extention به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و پس از تکثیر وجود توالی پرایمر 5-GGT GAC TGC GGC TGT TAT GG-3 forward و 5-GGC CAA TAG GTC CGC CAA CG- 3 reverse بررسی گردید.

برای بررسی وجود سودوموناس طبق دستور استاندارد بررسیهای آب و فاضلاب انجام گرفت. (۱۷)، در این ارتباط ابتدا نمونه‌های آب در محیط برگینت گرین لاکتوز بایل براث کشت داده شدند و نمونه‌های رشد کرده جهت تأیید وجود سودوموناس در محیط سیتریمیت آگار کشت داده شدند.

ایجاد کلنی سبز رنگ بعد از انکوبه کردن محیطها به مدت ۲۴ ساعت در ۴۴ درجه سانتی‌گراد بیانگر وجود سودوموناس آئروژنز بود که با تست اکسیداز نیز تأیید گردید.

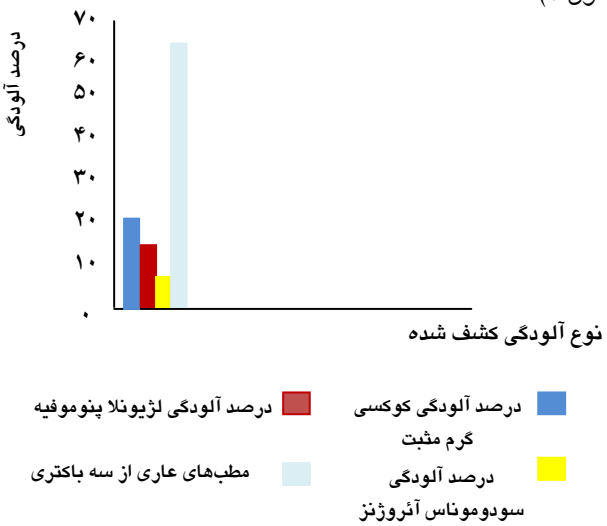
جهت بررسی وجود کوکسی‌های گرم مثبت نیز ابتدا از هر نمونه چندین اسمیر روی لام تهیه و پس از رنگ آمیزی گرم و اثبات وجود نمونه‌های گرم مثبت آنها را روی محیط کشت Blood agar کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۴۸ ساعت انکوبه گذاری شدند. (۱۸)

پس از آن داده‌ها جمع‌آوری و با نرم افزار SPSS نسخه‌بیست مورد آنالیز قرار گرفتند و در قالب جدول و نمودار بر حسب تعداد و درصد گزارش شدند.

یافته‌ها

از پنجاه مطب دندانپزشکی مورد بررسی هیچ یک از نمونه‌های کنترل از آب شهری رشد نکردند. ۳۲ مورد از نمونه‌های تست نیز از نظر سه گونه باکتری لژیونلا پنوموفیه، کوکسی‌های گرم مثبت و سودوموناس آئروژنز منفی بودند. (نمودار ۱)

اما در ۱۸ مطب نتیجه تست این سه باکتری مثبت شد. (جدول ۱)



نمودار ۱: درصد مطبهای آلوده و یا عاری از سه باکتری

جدول ۱: تعداد یونیت مطبهای آلوده به باکتری‌ها

باکتری	تعداد نتیجه مثبت تست
کوکسی گرم مثبت	۸
لژیونلا پنوموفیه	۵
سودوموناس آئروژنز	۳
کوکسی گرم مثبت و ژیونلا	۱
کوکسی گرم مثبت و سودوموناس آئروژنز	۱

بحث

در این مطالعه آلودگی به سه باکتری مهم در ایجاد عفونتهای تنفسی برای بیماران و دندانپزشکان مورد بررسی قرار گرفت و در ۳۶٪ مطبهای سطح شهرستان حداقل یک باکتری مثبت گزارش گردید.

مطالعات متعددی در زمینه اندازه‌گیری باکتری‌ها صورت گرفته است. Turetgen در سال ۲۰۰۹ میزان آلودگی میکروبی آب خروجی از یونیت‌های دندانپزشکی را به خصوص در مورد لژیونلا پنومونی بالاتر یافتند. (۱۹)، Ma'ayeh هم در سال ۲۰۰۷ گزارش کرد میزان آلودگی یونیت‌های دندانپزشکی به باکتری لژیونلا ارتباط مستقیمی با میزان استفاده از آن

www.SID.ir

Archive of SID

دارد. (۲۰)، در مورد اهمیت عفونت‌زایی این باکتری‌ها به خصوص سودوموناس در عفونتهای پوستی- مخاطی در مطالعه‌ای در ایالات متحده ۹۵۱ مورد عفونت در استخرهای حاوی بیوفیلم گزارش شد. (۲۱)

Ghasempour و همکاران نیز در مطالعه‌ای در سطح شهر بابل وجود کوکسی‌های‌گرم مثبت و سودوموناس آئروژنز را مثبت گزارش کردند. (۲۲)، Araujo نیز در سال ۲۰۰۲ یکی از روشهای انتقال سودوموناس به دندانپزشکان را محیط کارشان و آیروسل‌های دندانپزشکی دانست. (۲۳)

Abbasi و همکاران نیز در دانشگاه شهیدبهشتی وجود کوکسی‌های گرم مثبت در آب یونیت‌ها را گزارش کردند. (۱۸) در مطالعه حاضر شایعترین باکتری یافت شده کوکسی‌های گرم مثبت بودند که نشان دهنده اهمیت این باکتری‌ها در آلودگی آب یونیت‌هاست که همسو با اطلاعات مطالعه Murphy و همکاران می‌باشد. (۲۴)، نکته مورد توجه در این مطالعه کشف شش مورد باکتری لژیونلا در سیستم آب یونیت‌های مطبهای خصوصی شهرستان بود. در حالی که در سایر یونیت‌ها این باکتری یافت نشد. باکتری که به علت مشکلات کشت تاکنون مورد بررسی در سیستم آبی یونیت‌های کشور قرار نگرفته بود، اما در این مطالعه با روش PCR و از طریق شناسایی توالی mip که جهت شناسایی سویه عفونت‌زای پنوموفیه اختصاصی است (۱۶) استفاده گردید. با توجه به این نکته که پرسنل دندانپزشکی درجه بالاتری از مثبت بودن آنتی بادی سرمی لژیونلا را نشان می‌دهند. (۱۳)

کشف آلودگی ۱۲درصدی یونیت‌های یک شهرستان به این باکتری نگران‌کننده به نظر می‌رسد. شاید در مطبهای آلوده به این باکتری پرسنل یا بیماران خاص از طریق آلودگی بر عکس (Backward contamination) سیستم که در توربین‌ها هم دیده شده مقصر بوده باشد. (۶)، در مورد سودوموناس آئروژنز نیز این نکته را باید مد نظر داشت که این باکتری علاوه بر عفونت تنفسی در محیطهای زخم دار اولین عامل سپتی سمی محسوب می‌شود (۲۵) و در این مطالعه در ۶٪ یونیت‌ها کشف شد. هر چند این بررسی در مطبهایی انجام شد که اجازه تحقیق را دادند ولی در همین مطبهای محدود هم نتایج مثبت از حدود یک سوم مطبها می‌تواند هشداری به جامعه دندانپزشکی کشور در زمینه کنترل عفونت باشد. تنوع باکتریایی یافت‌شده می‌تواند به‌علل مدت زمان استفاده، روشها و دقت مطبها در کنترل عفونت و سلامت و سن سیستم‌های لوله‌کشی مطب باشد. با توجه به یافته‌های این مطالعه باید در مطالعات آتی اثر افزودن انواع مختلف ضدعفونی‌کننده‌ها، استفاده از سیستم لوله‌کشی پوشیده از ضدعفونی‌کننده، استفاده از مخزن آب به مطبها جهت ضدعفونی‌کردن راحت‌تر و طراحی سیستم‌های مخرب بیوفیلم سنجیده شود. همچنین مطالعاتی در زمینه سنجش میزان استفاده پرسنل دندانپزشکی از وسایل حفاظتی به ویژه در هنگام جرم‌گیری و برساژ باید صورت‌گیرد. علاوه برآن باتوجه به اینکه امروزه ویروس‌های مقاوم و خطرناکی در حال شیوع هستند باید مطالعاتی روی وجود این نوع از ویروس‌ها در وسایل آبی مطبها صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس این یافته‌ها خطر وجود باکتری‌های خطرناک در بیوفیلم یونیت‌ها هست و باید روی سلامت آب مورد استفاده در اعمال دندانپزشکی و روشهای استریل سازی وسایلی مثل جرم‌گیرها و سلامت کامل سیستم آبرسانی و فلاشینگ در مطبها دقت ویژه‌ای شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات فراوان دکتر امید صوابی معاونت محترم پژوهشی دانشکده، قدردانی می‌گردد. این طرح به شماره ۲۹۳۱۵۶ در شورای پژوهشی دانشکده دندانپزشکی به تصویب رسید و تأمین بودجه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Szymanska J, Wdowiak L, Puacz E, Stojek NM. Microbial quality of water in dental unit reservoirs. Ann Agric Environ Med. 2004 Nov ;11(2):355-358.

2. Samyari H, Jalayer T, Asadian H. [Infection control in dentistry].1st ed. Tehran:Azma;2004,125. (Persian)

3. Singh R, Stine OC, Smith DL, Spitznagel JK Jr, Labib ME, Williams HN. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. Appl Environ Microbiol. 2003 Jun;69(6):3412–3420.

4. Fotos PG, Westfall HN, Synder IS, Miller RW, Mutchler BM. Prevalence of legionella lgM antibody in a dental clinic population. J Dent Res. 1985 Dec; 64(12):1328-1385.

5. Reinthaler FF, Mascher F, Stunzer D. Serological examination for antibodies against Legionella in dental personnel. J Dent Res. 1998 Jun; 67(6):942-943.

6. Franco FFS, Spratt D, Leao JC, Porter SR. Biofilm formation and control in dental unit waterlines. Biofilms 2005 Nov;44(11):1019-1028.

7. Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR,Martin MV, Marsh PD. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. Appl Environ Microbiol. 2000 Aug; 66 (8):3363-3367.

8. O'Donnell MJ, Boyle MA, Russell RJ, Coleman DC. Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century Future Microbiol. 2011 Oct;6(10):1209-1226.

9. Miller CH, Palenik CH. Infection control and management of hazardous materials for the dental team. 3th ed. Philadelphia: Mosby;2005,190-204.

10. Andersen HK, Fiehn NE, Larsen T. Effect of steam sterilization inside the turbinechambers of dental turbine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999 Feb;87(2):184-188 .

11. Pankhurst CL, Philpoott-Howard J. Microbiological quality of water in dental chair unit. J Hos Inf. 2004 Mar; 23(3):167-174.

12. Waki MY, Jolkovsky DL, Otomo-Corgel J, Lofthus JE, Nachnani S, Newman MG, et al. Effects of subgingival irrigation on bacteremia following scaling and root planing. J Periodontol. 1990 Jul;61(7):405-411.

13. Pouralibaba F, Balaei E, Kashefimehr A. Evaluation of gram negative bacterial contamination in dental unit water supplies in a university clinic in Tabriz, Iran Dent Res Dent Clin Dent Prospect. 2011 May;5(3):94-97.

14.World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. Nurs Ethics. 2002 Jan; 9 (1):105-109.

15. Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004 Dec; 23(12):871-878.

16. Lindsay DS, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of mip Gene by PCR for diagnosis of legionnaires' disease. J Clin Microbiol. 1994 Dec; 32(12):3068-3069.

17. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Philadelphia:Mosby; 2005,64-89.

18. Abbasi F, Bakhtiari S, Eslami g, Ghaem maghami A. Prevalence of gram positive cocci contamination in the water lines of Shahid Beheshti Dental School units and drinking water supply of local area. J Dent Sch. 2005 Jun; 23(2):256-258.

19. Türetgen I, Göksay D, Cotuk A.Comparison of the microbial load of incoming and distal outlet waters from dental unit water systems in Istanbul. Environ Monit Assess. 2009 Nov;158(1-4):9-14.

20. Ma'ayeh SY, Al-Hiyasat AS, Hindiyeh MY, Khader YS. Legionella pneumophila contamination of a dental unit water line system in a dental teaching centre. Int J Dent Hyg. 2008 Feb;6(1):48-55.

21. Freije MR. Spas, hot tubs and whirlpool bathtubs: A guide for disease prevention. 1st ed.USA: HC Information Resources Inc; 2000,1-3.

22. Ghasempour M, Ghobadi Nejad MR, Haji Ahmadi M, Shakki H. Microbiological evaluation of dental unit water at dental offices and dental school in the city of Babol. J of Dent, Mashhad Univ of Med Sci. 2005July; 29(1):97-104.

23. Araujo MW, Andreana S. Risk and prevention of transmission of infectious diseases in dentistry. Quintessence Int. 2002 May;33(5):376-82.

24. Bagge BS, Murphy RA, Anderson AW, Punwani I. Contamination of dental unit cooling water with oral microorganisms and its prevention. J Am Dent Assoc. 1984 Nov; 109(5):712-726.

25. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick&Adelbergs Medical Microbiology. 26th ed. USA: LANGE Basic Science Series; 2013,284.

www.SID.ir