

روش‌های تشخیص آلودگی میکروبی در فرآورده‌های تغلیظ شده پلاکت

دکتر منیره رحیم‌خانی^۱، زهرا علیزاده محمدشیر^۲، یوسف عرفانی^۳

چکیده

سابقه و هدف

فرآورده‌های خونی خصوصاً پلاکت‌ها، طی فرآیند تهیه و تولید در معرض آلودگی قرار می‌گیرند. مواردی از سستی سمی و حتی شوک و مرگ ناشی از تزریق فرآورده‌های خونی خصوصاً پلاکت که شرایط نگهداری در حرارت محیط ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) را دارد، دیده شده است. در این تحقیق چهار روش تشخیص میکروبی روی ۱۲ واحد پلاکت که توسط باکتری‌های شناخته شده با تعداد معین آلوده شده‌اند، با هم مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. تعداد ۱۲ واحد پلاکت کنسانتره در حداقل فاصله زمانی پس از تولید، تهیه شد. به ۱۰ عدد از کیسه‌های پلاکت به طور جداگانه باکتری‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و اشیریشیا کولی با تعداد ۱۵۰، ۱۵ و ۱/۵ عدد در هر میلی‌لیتر تزریق شده و دو کیسه نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. کیسه‌های پلاکت در حرارت محیط ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) نگهداری شده، در فواصل زمانی ۲۴ ساعت تا ۵ روز، از کیسه در شرایط استریل نمونه‌برداری شد. به چهار روش زیر نمونه‌ها بررسی شدند: ۱- کشت ۲- اندازه‌گیری pH توسط pH متر الکتریکی ۳- اندازه‌گیری میزان گلوکز ۴- تهیه اسمیر و رنگ‌آمیزی گرم.

یافته‌ها

میانگین میزان pH در کیسه‌های پلاکت آلوده شده سیر نزولی بسیار منظمی را نشان داد، چنانچه در روز پنجم به طور میانگین به ۶/۲ رسید. اما در میزان pH کیسه‌های شاهد تغییرات نزولی بسیار مختصر بود. مقدار گلوکز اولیه کیسه‌های پلاکت به دلیل استفاده از دکستروز از نظر مقدار، بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم درصد بود. در کیسه‌هایی که توسط باکتری آلوده شده بودند نسبت به کیسه‌های شاهد مقدار گلوکز سیر تقریباً نزولی اما نه چندان منظم را نشان داد. بررسی‌های میکروب شناسی نشان داد که واحدهای پلاکتی که توسط اشیریشیا کولی و استافیلوکوک اپیدرمیدیس با تعداد ۱۵۰ عدد در هر میلی‌لیتر آلوده شده بودند همگی در روز دوم تحقیق کشت مثبت و اسمیر مثبت داشته‌اند. در واحدهایی که با تعداد کمتری باکتری آلوده شده بودند، نتایج کشت و اسمیر پس از ۳ یا ۴ روز مثبت شدند. در مورد کیسه‌های پلاکت شاهد، تا پایان تحقیق از نظر کشت میکروبی و لام رنگ‌آمیزی، منفی باقی ماندند.

نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده و مقایسه نتایج حاصله، اندازه‌گیری pH کیسه‌های حاوی پلاکت تغلیظ شده سریع‌ترین روش برای تشخیص آلودگی میکروبی در فرآورده‌های خونی می‌باشد. البته جهت مقایسه بین مقادیر به دست آمده بایستی میزان میانگین pH پلاکت تغلیظ شده از قبل تعیین شده باشد.

کلمات کلیدی: پلاکت، گلوکز، روش کشت

تاریخ دریافت: ۱۶/۵/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۶/۱۰/۲۶

۱- مؤلف مسئول: PhD میکروبی‌شناسی - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - صندوق پستی ۴۶۴۶

۲- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

فرآورده‌های خونی به ویژه محصولات پلاکتی در خطر آلودگی باکتریایی هستند، چرا که این محصولات بایستی در دمای ۲۰ الی ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند و این دما، درجه حرارت مناسب جهت زیست و عملکرد باکتری‌ها می‌باشد (۱). بنابراین باکتری‌ها با این که از قدیمی‌ترین عوامل شناخته شده ایجاد عفونت در اثر انتقال خون می‌باشند، امروزه معمول‌ترین خطر ابتلا به عفونت در اثر تزریق خون بوده و در مواردی تهدید کننده‌تر از ویروس‌هایی نظیر HIV و هپاتیت می‌باشند. به طوری که خطر دریافت پلاکت آلوده به باکتری ممکن است ۵۰ تا ۲۵۰ برابر بیشتر از خطر دریافت عفونت‌های ایدز و هپاتیت‌های B، C و یا عفونت‌های HTLV I, II در یک واحد خون باشد. در سال‌های اخیر با روش‌های تشخیص سریع، خون‌های اهدایی از نظر آلودگی به ویروس‌های فوق غربالگری می‌شوند. بنابراین با تدابیری نظیر گزینش دقیق اهداکنندگان در مراکز انتقال خون و انجام آزمایش‌های غربالگری و تاییدی، به طور موثری از انتقال عوامل ویروسی جلوگیری شده است اما به آلودگی باکتریایی که می‌تواند عامل مشکلات اساسی در فرد گیرنده باشد اهمیت زیادی داده نشده است (۲). با انجام آزمایش‌های تشخیص ویروس، خطر انتقال ویروس HIV ۱ در ۱۴۰۰۰۰۰ تا ۲۴۰۰۰۰۰ واحد، ویروس هپاتیت B ۱ در هر ۲۰۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰۰ واحد و ویروس هپاتیت C ۱ در هر ۱۰۰۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰۰ واحد خون یا فرآورده خونی تزریقی می‌باشد (۳، ۴).

در اواخر سال ۱۹۹۰، استراتژی‌های مختلفی جهت کاهش خطرات ذکر شده در نظر گرفته شده که شامل اعمال ضد عفونی کردن پوست، حذف چند میلی‌لیتر اولیه خون اهداکننده و تشخیص آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های خونی می‌باشد. روش مناسب برای تشخیص آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های خونی از جمله پلاکت، بایستی ساده، سریع و به اندازه کافی حساس و اختصاصی باشد تا از تزریق پلاکت آلوده به بیمار و نیز از نتایج مثبت کاذب که منجر به حذف غیر ضروری محصولات سالم می‌شود جلوگیری کند و از طرفی مقرون به صرفه نیز

باشد. در حال حاضر چنین روش مناسبی وجود نداشته و همه روش‌های در دسترس محاسن و معایبی دارند. در سال‌های اخیر استفاده از نوارهای pH و اندازه‌گیری میزان گلوکز موجود در کیسه‌های حاوی پلاکت جهت تشخیص آلودگی باکتریایی توسط برخی از محققین توصیه شده است. نتیجه تحقیقات این افراد نشان داده است که اگر میزان باکتری در واحدهای پلاکتی آلوده شده به ۱۰ الی ۱۰۰ میلیون باکتری (CFU) در واحد برسد، میزان گلوکز و pH واحدهای پلاکتی آلوده شده غیر طبیعی می‌گردد (۵).

تخمین زده شده که یک مورد در هر ۴۰۰۰ مورد تزریق پلاکت کنسانتره، منجر به واکنش عفونی شدید و یک مورد در هر ۱۷۰۰۰ مورد تزریق پلاکت، منجر به مرگ بیمار از طریق آلودگی باکتریایی شده است. بر اساس گزارش FDA، از ۱۸۲ مورد مرگ ناشی از انتقال خون بین سال‌های ۱۹۸۶ تا ۱۹۹۱، ۲۹ مورد (۱۶٪) به دلیل آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی بوده که از این تعداد ۲۱ مورد (۷۲٪) تزریق پلاکت داشته‌اند. نتایج فوق بر اساس کشت خون بیماران و کشت باقیمانده پلاکت تزریق شده به دست آمده است (۲). هم چنین بر اساس جدیدترین آمار منتشره، از هر ۴۰۰۰ تا ۵۰۰۰ واحد پلاکت متراکم تزریق شده، یک واحد منجر به عفونت شدید باکتریال در گیرنده شده و میزان مرگ و میر آن نیز یک مورد در هر ۱۷ هزار تا ۶۵ هزار واحد پلاکت تزریقی می‌باشد (۶، ۷).

بر خلاف گلبول‌های قرمز، پلاکت‌ها می‌توانند در دمای اتاق تا ۵ روز پس از تولید مورد استفاده قرار گیرند که این زمان و دما شرایط مناسب جهت رشد باکتری‌ها می‌باشد و از این جهت نسبت به سایر فرآورده‌های خونی به آلودگی حساس‌ترند (۸).

روش‌های سریع دیگری برای تشخیص آلودگی میکروبی در کیسه‌های حاوی پلاکت تغلیظ شده مانند فلوپیتومتری، PCR و BACT/ALERT وجود دارد اما با به زمان طولانی نیاز دارند و با هزینه‌بر هستند (۹). مثلاً روش استخراج DNA و مراحل انجام PCR، حداقل به یک روز زمان نیاز داشته و علاوه بر آن دستگاه ترموسیکلر نیز مورد نیاز است (۹، ۱). هم چنین روش

تشخیص آلودگی باکتریایی می‌باشد برای آشکارسازی آلودگی میکروبی در کیسه‌های پلاکت مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق ۵۱ واحد پلاکت توسط باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، باسیلوس سرئوس، کلبسیلا پنومونیه و سراشیا مرسیس آلوده شدند. پس از تلقیح باکتری‌ها، پلاکت‌ها در دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و روزانه از کیسه‌های پلاکت نمونه‌برداری و توسط استریپ‌های تشخیص گلوکز ادرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان گلوکز در کیسه‌های پلاکت از میانگین ۳۶۰ میلی‌گرم در روز صفر به ۲۳۰ میلی‌گرم در روز ششم رسیده بود. حساسیت و ویژگی روش انجام گرفته به ترتیب ۹۵٪ و ۱۰۰٪ بوده است (۸).

در تحقیق مشابه دیگری نیز میزان pH و گلوکز واحدهای پلاکت تغلیظ شده توسط روش هگزوکیناز و الکترو pH اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان گلوکز و pH با گذشت زمان کاهش می‌یابند. حساسیت و ویژگی روش انجام گرفته به ترتیب ۹۶٪ و ۹۸٪ بوده است (۸، ۱۴). هدف اصلی از این تحقیق مقایسه چهار روش تشخیص آلودگی میکروبی پلاکت‌های کنسانتره که در سازمان انتقال خون تهیه می‌گردد می‌باشد. تعداد ۱۲ واحد پلاکت کنسانتره (در حداقل زمان پس از تهیه) از سازمان انتقال خون خریداری شده و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پیراپزشکی انتقال داده شد (در دو مرحله اجرایی و در هر مرحله ۶ واحد).

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. از آنجایی که در مطالعات مشابه گذشته، تعداد نمونه‌های مورد بررسی در حدود ۱۰ تا ۱۵ واحد بوده است لذا در این تحقیق نیز تعداد ۱۲ کیسه پلاکت تغلیظ شده تهیه شده از پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت (۸، ۵).

قبل از تزریق باکتری به کیسه‌ها، از تمامی ۱۲ کیسه پلاکت کنسانتره نمونه‌برداری شد و بر روی محیط‌های کشت خون، کشت داده شدند که نتیجه کشت در مورد

BACT/ALERT (بیومریوکس) که بر مبنای میزان مصرف اکسیژن در نتیجه آلودگی باکتریایی احتمالی در کیسه‌های پلاکت می‌باشد، نیاز به دستگاه اتومیشن برای اندازه‌گیری تغییرات گازهای موجود در محتویات ماده مورد بررسی دارد (۹). در یکی از بررسی‌های انجام شده، تعدادی از واحدهای کنسانتره پلاکت را با باکتری (با تعداد مشخص) آلوده کردند و تنها پس از ۲۴ ساعت نگهداری در حرارت آزمایشگاه میزان اکسیژن موجود در کیسه آلوده در مقایسه با کیسه‌های سالم کاهش چشمگیری داشت و پیشنهاد شد که برای تشخیص آلودگی پلاکت‌های کنسانتره می‌توان از این روش استفاده کرد (۱۰).

در تحقیق دیگری آلودگی میکروبی پلاکت‌های کنسانتره توسط اندازه‌گیری pH تشخیص داده شد، به این ترتیب که pH ۳۷۰۶۰ واحد پلاکت کنسانتره اندازه‌گیری شده که از این تعداد در ۴۰۵ مورد pH کمتر از ۷ بود. باکتری‌های جدا شده از کیسه‌های آلوده عبارت بودند از استاف اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، دیفتروئید و استافیلوکوک کواگولاز منفی. بنابراین اندازه‌گیری pH به عنوان آزمایش غربالگری خوبی برای تشخیص آلودگی‌های میکروبی پلاکت‌های کنسانتره معرفی شد (۱۱).

در یک بررسی ۱۲ ماهه بر روی ۳۱۴۱ کیسه پلاکت، نشان داده شد که میزان آلودگی برای واحدهایی که کمتر از ۴ روز نگهداری شده بودند، ۱/۸ در هر ۱۰۰۰۰ واحد پلاکت، در حالی که برای واحدهایی که به مدت ۵ روز نگهداری شده بودند، ۱۱/۹ در هر ۱۰۰۰۰ واحد پلاکت بوده است. روش تشخیص آلودگی میکروبی در این تحقیق، کشت و رنگ‌آمیزی‌های گرم و آکریدین اورنج بوده است. در این مقاله پیشنهاد شده که برای واحدهایی که بیش از ۴ روز نگهداری شده‌اند، بایستی کشت میکروبی و رنگ‌آمیزی گرم و آکریدین اورنج انجام شود البته مشاهده میکروسکوپی حساسیت پایینی داشته و تنها زمانی که تعداد باکتری به ۱۰۰۰۰۰ عدد در هر میلی‌لیتر برسد، این روش نتیجه می‌دهند (۱۲، ۱۳).

در مقاله تحقیقی دیگری استفاده از استریپ‌های تشخیص گلوکزادرار که روش سریع، آسان و ارزانی برای

ابتدا دستگاه توسط سه بافر استاندارد با pH های ۴، ۷ و ۱۰ کالیبره سپس pH نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. مابقی محتویات سرنگ را نیز به لوله آزمایش دیگری انتقال داده تا سانتریفوژ شده و از رسوب آن گسترش تهیه شود، منتهی قبل از سانتریفوژ مقدار گلوکز آن توسط روش گلوکز اکسیداز اندازه‌گیری شد. برای این کار از کیت گلوکز پارس آزمون استفاده شد. گسترش‌های تهیه شده نیز با روش رنگ‌آمیزی گرم، رنگ شده و توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند (۸، ۵). جهت افزایش دقت در نتایج به دست آمده، هر کدام از اندازه‌گیری‌ها دو بار انجام گرفته و میانگین به دست آمده به عنوان نتیجه نهایی در جداول گزارش شد.

یافته‌ها

میانگین مقدار گلوکز اندازه‌گیری شده در کیسه‌های پلاکت قبل از تزریق باکتری ۳۸۱ میلی‌گرم درصد با انحراف میانگین ۹۳ میلی‌گرم درصد می‌باشد. برای هر رقت از باکتری، دو کیسه پلاکت در نظر گرفته شد. به این ترتیب که برای رقت‌های ۱۵۰، ۱۵ و ۱/۵ باکتری در میلی‌لیتر، اشیریشیا کلی در جمع ۶ کیسه پلاکت مورد استفاده قرار گرفت. در مورد استافیلوکوک اپیدرمیدیس نیز دو رقت ۱۵۰ و ۱۵ باکتری در میلی‌لیتر تهیه شده و به چهار کیسه پلاکت تزریق شد. به طوری کلی هر رقت از هر باکتری به دو کیسه پلاکت تزریق گردید و از آن جایی که استاف اپیدرمیدیس تکثیر آهسته‌ای دارد بنابراین از رقت ۱/۵ آن در تحقیق حاضر استفاده نشد. هم‌چنین علت استفاده از سه رقت برای اشیریشیا کلی این بود که این باکتری، باکتری غالب در مورد آلودگی هر گونه فرآورده‌ای در پروسه تولید می‌باشد. از آن جایی که این باکتری تکثیر سریعی دارد بنابراین از رقت ۱/۵ اشیریشیا کلی نیز برای تزریق به کیسه‌های پلاکت استفاده شد (جدول ۱).

مقدار pH میانگین پلاکت‌ها قبل از تزریق باکتری ۷/۶۵ با انحراف میانگین ۰/۳۱ می‌باشد. اندازه‌گیری pH توسط متر الکتریکی ژنوا و با سه استاندارد ۴، ۷ و ۱۰ انجام گرفت. برای هر روز اندازه‌گیری pH، دستگاه pH متر الکتریکی توسط استانداردهای ذکر شده

تمام آن‌ها منفی بود. در مرحله بعد، ۱۰ کیسه توسط سوسپانسیون باکتری‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و اشیریشیا کلی با رقت‌های تهیه شده در مقایسه با استاندارد مک فارلن آلوده شدند. علت استفاده از این دو باکتری این است که بر اساس بررسی‌های گذشته‌نگر انجام گرفته، دو باکتری یاد شده در آلودگی پلاکت‌های تغلیظ شده بیشتر مطرح بوده‌اند (۱۶، ۱۵).

برای تهیه رقت‌های باکتریایی ابتدا سوسپانسیونی از باکتری مورد نظر در سرم فیزیولوژی استریل تهیه کرده به طوری که کدورت آن برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلن باشد. تعداد باکتری در این سوسپانسیون تقریباً $10^8 \times 1/5$ می‌باشد. سپس از این سوسپانسیون رقت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰۰۰۰ توسط سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. بنابراین تعداد باکتری در سه لوله آخر به ترتیب ۱۵، ۱۵۰ و ۱/۵ در هر میلی‌لیتر می‌باشد. در مورد باکتری اشیریشیا کلی از لوله‌های حاوی ۱۵۰، ۱۵ و ۱/۵ باکتری در میلی‌لیتر و در مورد استاف اپیدرمیدیس لوله‌های حاوی ۱۵۰ و ۱۵ باکتری در میلی‌لیتر، توسط سرنگ و در شرایط استریل از هر کدام یک میلی‌لیتر برداشت کرده و به کیسه‌های پلاکت تزریق شدند (۳).

بنابراین به ۱۰ کیسه حاوی پلاکت، باکتری تزریق شد و دو کیسه پلاکت نیز به عنوان شاهد یا کنترل در نظر گرفته شدند (بدون تزریق باکتری). در تمام مدت انجام تحقیق، کیسه‌ها در الکل ۷۰ درجه و در دمای محیط آزمایشگاه (۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. در فواصل زمانی ۲۴ ساعت به مدت ۵ روز از کیسه‌های پلاکت در شرایط استریل و توسط سرنگ نمونه‌برداری شد و آزمایش‌های زیر روی آن‌ها انجام گرفت. ابتدا حدود ۰/۱ میلی‌لیتر به بطری حاوی محیط کشت خون (Brain Heart Infusion broth) تزریق شد و یک قطره از آن نیز به صورت کشت خطی و ایزوله بر روی محیط بلادآگار کشت داده شد. بخشی از محتویات سرنگ در ظرف دیگری ریخته شد تا pH آن توسط دستگاه pH متر الکتریکی اندازه‌گیری شود. دستگاه pH متر مورد استفاده در این تحقیق از نوع pH متر دیجیتال ژنوا بود.

جدول ۱: مقادیر گلوکز کیسه‌های پلاکت آلوده شده و کنترل (mg/dl)

شماره کیسه	نوع باکتری تزریق شده	تعداد باکتری تزریقی	روز ۰	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
۱	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	۳۹۵	۲۵۸	۱۵۰	۸۸	۵۶	۶۳
۲	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	۴۵۱	۴۵۸	۳۸۴	۲۰۰	۱۴۰	۱۲۸
۳	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	۳۲۴	۳۴۰	۳۴۰	۲۳۷	۲۸۶	۲۷۰
۴	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	۳۶۰	۲۷۰	۳۵۴	۱۵۷	۱۵۰	۱۵۱
۵	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	۳۹۰	۲۷۴	۲۷۰	۲۵۰	۲۴۸	۲۴۱
۶	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	۳۴۲	۳۲۳	۳۳۹	۳۸۴	۱۳۰	۱۲۶
۷	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	۲۰۷	۱۸۰	۸۰	۳۵	۴۰	۱۹
۸	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	۴۵۰	۳۵۶	۳۵۰	۳۱۵	۲۳۸	۲۲۸
۹	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	۴۵۵	۴۴۰	۲۱۸	۲۲۳	۱۸۲	۱۵۹
۱۰	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	۳۸۰	۳۲۴	۳۱۰	۲۳۰	۲۳۸	۲۲۴
۱۱	کنترل	-	۴۷۲	۴۶۷	۴۲۰	۴۰۲	۳۸۰	۴۴۴
۱۲	کنترل	-	۳۴۶	۳۳۹	۳۳۳	۳۴۸	۳۵۰	۳۵۵

جدول ۲: مقادیر pH کیسه‌های پلاکت آلوده شده و کنترل

شماره کیسه	نوع باکتری تزریق شده	تعداد باکتری تزریقی	روز ۰	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
۱	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	۷/۳۶	۷/۱۹	۶/۶۹	۶/۲۵	۵/۴۰	۵/۴۰
۲	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	۷/۴۴	۶/۹۱	۶/۲۹	۵/۹۴	۵/۸۶	۵/۸۵
۳	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	۷/۳۳	۶/۸۱	۶/۵۸	۶/۲۶	۶/۰۴	۶/۰۱
۴	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	۷/۹۶	۷/۹۳	۷/۹۰	۷/۵۴	۷/۷۰	۷/۲۰
۵	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	۷/۸۷	۷/۸۹	۷/۸۶	۷/۸۹	۷/۴۰	۷/۱۲
۶	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	۷/۸۱	۷/۷۳	۷/۷۷	۷/۷۶	۷/۶۳	۷/۰۹
۷	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	۷/۶۸	۷/۴۶	۶/۶۸	۶/۶۷	۶/۵۴	۵/۹۷
۸	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	۷/۳۶	۶/۴۷	۵/۹۷	۵/۸۸	۵/۸۵	۵/۷۸
۹	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	۷/۴۸	۷/۱۹	۶/۹۴	۶/۶۶	۶/۱۴	۵/۵۲
۱۰	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	۷/۷۲	۷/۵۱	۷/۱۸	۷/۰۴	۶/۸۸	۶/۶۸
۱۱	کنترل	-	۷/۸۲	۷/۸۴	۷/۸۵	۷/۸۲	۷/۷۸	۷/۶۹
۱۲	کنترل	-	۷/۹۷	۷/۹۳	۷/۹۷	۷/۸۸	۷/۸۴	۷/۸۰

در مورد کیسه‌های پلاکت شاهد نیز کاهش بسیار مختصری در میزان pH مشاهده شده که به دلیل مصرف گلوکز توسط پلاکت‌ها و تولید اسیدلاکتیک می‌باشد (جدول ۲).

کشت نمونه‌های شاهد که بدون باکتری بوده‌اند تا پایان

کالبره و سپس pH نمونه‌ها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در کیسه‌هایی که تعداد بیشتری باکتری تزریق شده بود (۱۵۰/ml)، سیر نزولی pH سریع‌تر بوده و در روز پنجم به حدود ۵ رسید. در حالی که در مواردی که تعداد باکتری تزریقی کمتر بوده، سیر نزولی کندتر بوده است.

جدول ۳: نتایج کشت کیسه‌های پلاکت تغلیظ شده (محیط‌های BHI broth و Blood agar)

شماره کیسه	نوع باکتری تزریق شده	تعداد باکتری تزریقی	روز ۰	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
۱	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۲	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۳	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	-	-	-	-	-	-
۴	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۵	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	-	-	-	+	+	+
۶	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	-	-	-	-	-	+
۷	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۸	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۹	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	-	-	-	+	+	+
۱۰	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	-	-	-	-	-	+
۱۱	کنترل	-	-	-	-	-	-	-
۱۲	کنترل	-	-	-	-	-	-	-

جدول ۴: نتایج بررسی میکروسکوپی رسوب پلاکت‌های تغلیظ شده (رنگ آمیزی گرم)

شماره کیسه	نوع باکتری تزریق شده	تعداد باکتری تزریقی	روز ۰	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
۱	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۲	اشریشیا کلی	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	-	-	-	-
۳	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	-	-	-	-	-	-
۴	اشریشیا کلی	۱۵ میلی لیتر	-	-	+	-	-	-
۵	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	-	-	-	+	+	+
۶	اشریشیا کلی	۱/۵ میلی لیتر	-	-	-	-	-	-
۷	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۸	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵۰ میلی لیتر	-	-	+	+	+	+
۹	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	-	-	-	+	+	+
۱۰	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۱۵ میلی لیتر	-	-	-	-	-	-
۱۱	کنترل	-	-	-	-	-	-	-
۱۲	کنترل	-	-	-	-	-	-	-

پلاکت سانتریفوژ شد. از رسوب آن دو گسترش تهیه و تحت رنگ آمیزی گرم قرار گرفته و توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. با دیدن حتی یک باکتری، نتیجه مثبت در نظر گرفته شد. هر چهار کیسه پلاکت که ۱۵۰ باکتری در میلی لیتر (اشریشیا کلی یا استافیلوکوک

تحقیق هم چنان منفی باقی ماند و نتایج کشت مابقی کیسه‌های پلاکت در روزهای متفاوتی که بسته به تعداد باکتری تزریقی بود مثبت شد (جدول ۳). روزانه از کیسه‌های پلاکت نمونه برداری شده و پس از انجام آزمایش‌های مربوطه، در پایان کار لوله آزمایش حاوی

اپیدرمیدیس) به آن‌ها تزریق شده بود، در روز دوم نتیجه کشت مثبت داشته از نظر لام گرم متغیر بودند. چنانچه در مورد استافیلوکوک اپیدرمیدیس نتایج لام نیز در روز دوم (هم‌زمان با نتیجه کشت) مثبت شد ولی در مورد اش‌ریشیا کلی یکی از کیسه‌ها در روز سوم لام گرم مثبت داشت و کیسه پلاکت دیگر تا پایان تحقیق از نظر نتیجه لام گرم، هم چنان منفی باقی ماند (جدول ۴).

بحث

هدف از تحقیق حاضر، مقایسه توصیفی چهار روش تشخیص آلودگی میکروبی در کیسه‌های حاوی پلاکت تغلیظ شده می‌باشد.

از آنجایی که با وجود تمامی تمهیداتی که در مراحل تهیه پلاکت انجام می‌گیرد تا از آلودگی میکروبی جلوگیری شود، با این حال پلاکت تغلیظ شده از اهداکنندگان متعددی تهیه می‌شود که ممکن است باکتری‌های بدون علامت داشته باشند و از طرفی دیگر شرایط نگهداری پلاکت بایستی در حرارت محیط باشد، بنابراین احتمال آلودگی میکروبی در روند تولید و به دنبال آن تکثیر باکتری‌ها در حرارت محیط زیاد می‌باشد. سالانه تعداد زیادی از بیمارانی که دریافت کننده پلاکت هستند، به باکتری‌می و یا سپتی سمی باکتریایی مبتلا شده که در مواردی منجر به مرگ آن‌ها شده است.

بررسی‌های متعددی در رابطه با هر یک از چهار روش ذکر شده به طور جداگانه انجام گرفته و در مورد معایب و محاسن آن‌ها در مقاله‌های مختلف بحث شده است. در این تحقیق بر روی کیسه‌های حاوی پلاکت تغلیظ شده هر چهار روش تشخیص آلودگی میکروبی انجام گرفت که عبارتند از: ۱- کشت میکروبی ۲- اندازه‌گیری pH ۳- اندازه‌گیری مقدار گلوکز ۴- تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم. همان‌طور که می‌دانیم در اثر وجود و تکثیر باکتری در هر محیطی از جمله کیسه‌های حاوی پلاکت تغلیظ شده، گلوکز موجود در محیط توسط باکتری‌ها مصرف می‌شود. هر چه تعداد باکتری بیشتر باشد، کاهش گلوکز نیز بیشتر است. بنابراین اندازه‌گیری میزان گلوکز در کیسه‌های حاوی پلاکت می‌تواند نشان‌دهنده آلودگی میکروبی در این

فرآورده خونی باشد. اما این روش تشخیص آلودگی میکروبی اشکال عمده‌ای دارد و آن این که به دلیل استفاده از دکستروز در پروسه تولید و تغلیظ پلاکت، مقدار گلوکز اندازه‌گیری شده با روش هگزوکیناز بیشتر از مقدار طبیعی گلوکز موجود در خون است. از طرفی دیگر مقدار دکستروزی که به کیسه اضافه می‌شود ممکن است که از نظر مقیاس گرم مقدار ثابتی باشد اما چون اندازه‌گیری گلوکز با روش هگزوکیناز با مقیاس میلی‌گرم درصد می‌باشد بنابراین مقدار گلوکز اندازه‌گیری شده در نمونه‌های پلاکت قبل از تزریق باکتری با یکدیگر متفاوت بوده است. چنانچه مقدار گلوکز در پلاکت تغلیظ شده سالم و در روز اول تولید در مقالات مختلف ۳۶۰ mg/dl یا ۳۴۶ mg/dl و یا ۲۵۵ mg/dl گزارش شده است (۱۸، ۱۷، ۵). بنابراین در تحقیق حاضر نیز مقادیر گلوکز در کیسه‌های پلاکت قبل از تزریق باکتری متغیر بود، به این ترتیب که کیسه شماره ۱۱ حاوی ۴۷۲ میلی‌گرم گلوکز درصد میلی‌لیتر و کیسه پلاکت شماره ۷ حاوی ۲۰۷ میلی‌گرم درصد گلوکز بود. بنابراین گلوکز کیسه‌های حاوی پلاکت مقدار ثابتی ندارد اما آن چه قطعی بوده و با نتایج این تحقیق نیز سازگاری دارد این که در اثر آلودگی پلاکت‌ها با باکتری، متوسط میزان گلوکز اندازه‌گیری شده کاهش یافته و این کاهش منظم می‌باشد (به غیر از چند مورد استثنا که ممکن است به دلیل عدم همگن و یکنواخت بودن نمونه‌های پلاکت باشد). به این ترتیب که هر روز نسبت به روز قبل مقدار گلوکز اندازه‌گیری شده کاهش می‌یابد. در مورد نمونه‌های کنترل، کاهش تدریجی در میزان گلوکز دیده شد که به دلیل مصرف گلوکز توسط پلاکت‌ها و کاهش مختصر در میزان گلوکز اندازه‌گیری شده است. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، اندازه‌گیری مقدار گلوکز برای تشخیص آلودگی میکروبی پلاکت‌ها، نتایج قابل اعتمادی ارائه نمی‌دهد، چرا که مقدار اولیه گلوکز موجود در نمونه‌ها مقدار ثابتی نمی‌باشد.

روش بعدی در تشخیص آلودگی میکروبی فرآورده‌های خونی، کشت آن‌ها بر روی محیط‌های کشت میکروبی‌شناسی و تهیه گسترش از نمونه و رنگ‌آمیزی گرم می‌باشد. در این تحقیق نیز این روش بر روی نمونه‌های

به طور کلی در اثر آلودگی میکروبی در هر محیطی، به دلیل تکثیر باکتری‌ها و افزایش فعالیت‌های متابولیسمی، میزان اسید لاکتیک و سایر اسیدهای محصول نهایی متابولیسم باکتری‌ها در محیط بالا رفته و به دنبال آن pH محیط کاهش می‌یابد. همان طور که قبلاً نیز ذکر گردید پلاکت تغلیظ شده به دلیل استفاده از اهداکنندگان متعددی که هر کدام ممکن است به باکتری‌ی بدون علامت مبتلا بوده‌اند و به دنبال آن فرآیند تولید و شرایط نگهداری محصول پلاکتی که در حرارت محیط است، بنابراین در مراحل تهیه پلاکت و یا در شرایط نگهداری، احتمال آلودگی باکتریایی آن بیشتر از سایر فرآورده‌های خونی می‌باشد. یکی از روش‌های تشخیص آلودگی میکروبی کیسه‌های حاوی پلاکت تغلیظ شده، اندازه‌گیری pH می‌باشد. میانگین pH کیسه‌های پلاکت در روز صفر و قبل از تزریق باکتری ۷/۶۵ بوده در حالی که در پایان روز پنجم میانگین pH به ۶/۲۶ رسید و این در حالی است که میزان pH در کیسه‌های پلاکت شاهد، تغییر چندانی پیدا نکرد. از طرفی دیگر تغییرات pH در کیسه‌های پلاکت آلوده منظم بوده و هر روز نسبت به روز قبل به طور متوسط کاهش نشان داد. نتایج نشان داد در کیسه‌هایی که تعداد باکتری تزریقی ۱۵۰ باکتری در میلی‌لیتر بود کاهش میزان pH بیشتر از مواردی بود که تعداد باکتری تزریقی ۱۵ یا ۱/۵ باکتری در میلی‌لیتر بود. چنانچه pH کیسه‌های پلاکتی که توسط ۱۵۰ باکتری در میلی‌لیتر آلوده شده بودند در روز دوم به کمتر از ۶/۸ رسید در حالی که تا روز دوم نتایج کشت منفی بود. بنابراین علاوه بر آن که میزان کاهش pH ارتباط مستقیم با تعداد باکتری موجود در محیط دارد، از نظر سرعت جواب‌دهی برای تشخیص آلودگی میکروبی اندازه‌گیری میزان pH زودتر و دقیق‌تر از سایر روش‌ها به نتیجه می‌رسد. روش کشت و مشاهده باکتری و یا کلنی آن بر روی محیط کشت، دقیق‌ترین روش برای تشخیص آلودگی میکروبی در هر محیطی است اما به دلیل وقت‌گیر بودن این روش‌ها خصوصاً در مورد تشخیص آلودگی میکروبی در پلاکت‌های تغلیظ شده که ممکن است خطر مرگ برای بیمار به همراه آورد بایستی از روش‌های سریع‌تری استفاده کرد.

پلاکت تغلیظ شده انجام گرفت. البته برای کشت از محیط‌های کشت خون و نیز از محیط‌های روتین بلاد آگار استفاده شد تا حتی‌المقدور از موارد منفی کاذب در نتایج کشت جلوگیری شود (۱۴). در کیسه‌های پلاکتی که تعداد باکتری تزریقی ۱۵۰ عدد در هر میلی‌لیتر بود، در روز دوم نتایج کشت مثبت بود که این امر در مورد هر دو نوع باکتری تزریقی، اش‌ریشیا کلی و استافیلوکوک اپیدرمیدیس اتفاق افتاد. در یکی از کیسه‌های پلاکت که توسط اش‌ریشیا کلی با تعداد ۱۵ باکتری در میلی‌لیتر آلوده شده بود، نتیجه کشت در روز دوم مثبت شد اما در کیسه دیگر با همین شرایط، تا پایان تحقیق نتیجه کشت منفی باقی ماند. این اختلاف در نتایج دو کشت شاید به دلیل اضافه شدن مواد ممانعت‌کننده در پلاکت تغلیظ شده باشد به این ترتیب که به دلیل جذب گلوکز توسط پلاکت‌ها جهت انجام اعمال متابولیسمی، اسید لاکتیک آزاد می‌شود و همان طور که می‌دانیم اسید لاکتیک برای باکتری‌ها سمی بوده و اگر تعداد باکتری موجود در محیط کم باشد و یا باکتری‌ها در فاز سکون باشند، سبب مرگ آن‌ها می‌گردد. به این ترتیب عدم رشد باکتری در محیط کشت حاوی نمونه یکی از کیسه‌های پلاکت حاوی ۱۵ باکتری اش‌ریشیا کلی شاید قابل توجه باشد. کیسه‌های پلاکتی که ۱/۵ باکتری اش‌ریشیا کلی در میلی‌لیتر به آن‌ها تزریق شد، نتیجه کشت یکی از آن‌ها در روز سوم و دیگری در روز پنجم مثبت شد.

در مورد بررسی بر روی گسترش‌های تهیه شده از رسوب پلاکت‌ها و رنگ‌آمیزی گرم، نتایج نشان داد که تنها در مواردی که تعداد باکتری تزریقی ۱۵۰ عدد در هر میلی‌لیتر بوده است، هم‌زمان با نتیجه کشت مثبت، بررسی لام رنگ‌آمیزی گرم نیز مثبت بوده است البته به غیر از یک مورد استثنا در مورد اش‌ریشیا کلی. در مورد سایر کیسه‌های پلاکت نتایج لام رنگ‌آمیزی یا با فاصله یک روز از نتایج کشت مثبت شد و یا تا پایان تحقیق با وجود آن که نتیجه کشت مثبت بود اما در گسترش‌های تهیه شده از رسوب پلاکت‌ها باکتری مشاهده نشد. بنابراین در مورد تشخیص آلودگی باکتریایی در کیسه‌های حاوی پلاکت تغلیظ شده تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم روش چندان مورد اعتمادی نبوده و تنها می‌تواند تاییدی بر نتایج کشت باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس مقایسه توصیفی بین چهار روش تشخیص آلودگی باکتریایی کیسه‌های پلاکت تغلیظ شده، هر چهار روش دارای معایب و محاسنی هستند. البته در بین روش‌های مورد بررسی، روش کشت میکروبی و مشاهده مستقیم باکتری دقیق‌ترین روش می‌باشد اما به دلیل این که حداقل به ۲۴ ساعت زمان نیاز است بنابراین در مورد تشخیص سریع آلودگی میکروبی در این گونه فرآورده‌ها کاربرد ندارد. اندازه‌گیری میزان گلوکز در کیسه‌های پلاکت نیز بنابر دلایل ذکر شده چندان روش مورد اعتمادی نیست. بنابراین در بین چهار روش به کار گرفته شده، اندازه‌گیری pH نمونه پلاکت سریع‌ترین روش برای تشخیص آلودگی باکتریایی در این فرآورده خونی می‌باشد.

در این تحقیق چهار روش تشخیص آلودگی میکروبی پلاکت تغلیظ شده با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند و بر اساس نتایج به دست آمده اندازه‌گیری pH پلاکت سریع‌ترین روش برای تشخیص آلودگی باکتریایی در محتویات کیسه‌های پلاکت تغلیظ شده می‌باشد. البته بایستی میانگین pH پلاکت تغلیظ شده از قبل تعیین شده باشد تا با مشاهده کاهش آن از تزریق فرآورده به بیماران جلوگیری شود. در مقالات مختلف میانگین pH ذکر شده برای پلاکت تغلیظ شده ۷/۴-۷/۲ بوده است (۱۱، ۱۲). در تحقیق حاضر میانگین میزان pH قبل از تزریق باکتری ۷/۶۵+۰/۳۱ به دست آمده که پس از گذشت دو روز از تزریق باکتری به کمتر از ۷ نزول پیدا کرده است. بنابراین

References:

- 1- Faurel. Rapid screening for bacterial contamination of blood products. *J Lab Med* 2006;30(2):91-100.
- 2- Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gegory Kr, Elder KV, Schreiber GB, *et al.* Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998-2000. *Transfusion* 2001;41:1493-8.
- 3- McPherson RA, Pincus RM. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21st Edition. Philadelphia: Saunders;2007.
- 4- Boon NB, Colledge NR, Walker BR, Hunter J. *Davidson's Principles and Practice of Medicine*. 20th ed. London: Churchill Livingstone;2005.
- 5- Wagner SJ, Robinette D. Evaluation of swirling, PH, and glucose tests for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfusion* 1996;36(11-12):989-93.
- 6- Nees H. *Blood banking and transfusion medicine basic principles and practice* 2007.
- 7- Goldman L, Ausiello DA. *Cecil Textbook of Medicine*. 22ed. Philadelphia:Saunders;2004.
- 8- Burstain JM, Brecher ME, Workman K, Foster M, Faber GH, Mair D. Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips: glucose and PH analysis as markers of bacterial metabolism. *Transfusion* 1997;37(3):255-8.
- 9- McDonald CP, Roy A, Lowe P, Robbins S, Hartley S, Barbara JA. Evaluation of the BacT/Alert automated blood culture system for detecting bacteria and measuring their growth kinetics in leucodepleted and non-leucodepleted platelet concentrates. *Vox Sang* 2001;81(3):154-60.
- 10- Fournier-wirth C, Deschaseaux M, Defer C, Godreuil S, Carriere C, Bertrand X, *et al.* Evaluation of the enhanced bacterial detection system for screening of contaminated platelet. *Transfusion* 2006;46(2):220-4.
- 11- Yazer MH, Triulzi DJ. Use of a PH meter for bacterial screening of whole blood platelets. *Transfusion* 2005;45(7):1133-7.
- 12- Burstain JM, Brecher ME, Workman K, Foster M, Faber GH, Mair D, *et al.* Strategies for preventing the bacterial contamination of platelet concentrates. *Curent Issues in Transfusion Medicine* 2006.
- 13- Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, Vostal JG, Epstein JS, Goodman JL. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies and regulation. *Hematology* 2003;575-89.
- 14- Yomtovian R, Lazatus HM, Hirshler NV, Morrissey AM, Jacobs MR. A prospective microbiologic surveillance program to detect and prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets. *Transfusion* 1993;33(11):902-8.
- 15- Liu HW, Yuen KY, Cheng TSY, Lee KB, Caua EK, Lin CK. Reduction of platelet transfusion associated sepsis by short-term bacterial culture. *Vox Sang* 1999;77:1-5.
- 16- Chiu EKW, Yuen KY, Lie AKW, Liang R, Lau YL, Lee AC, *et al.* A prospective study of symptomatic bacteremia following platelet transfusion and its management. *Transfusion* 1994;34:950-4.
- 17- Glaser A, Friedlein H, Zingman J, Zimmermann R, Welsbach V, Ruf A, *et al.* Storage of single donor platelet concentrates: paired comparison of storage as single or double concentrates. *J Clin Amphresis* 2001;16:148-54.
- 18- Nilkson H, Holme S, Murphy S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrated at 22°C. *Blood* 1984;64(2):406-14.

Microbial contamination detection methods in platelet concentrates

Rahimkhani M.¹(PhD), Alizadeh Mohammad Shir Z.¹(MS), Erfani Y.¹(MS)

¹Tehran University of Medical Sciences

Abstract

Background and Objectives

Bacterial contamination of blood products, especially platelets, may lead to bacterial sepsis or death and therefore is of concern. Many techniques have been explored to detect bacteria in blood products in order to prevent transfusion-related bacteria contamination and transmission. In the present study, four different methods were employed to detect 12 platelet units precontaminated with known bacteria.

Materials and Methods

Ten units of platelet concentrates were inoculated at three levels (150, 15, and 1.5 CFU per ml) with *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. All of the platelet concentrates and two control units of platelet concentrates were stored at 20 to 24°C for five days. Every morning during storage, platelet concentrates were tested for platelet pH, plasma glucose, quantitative plate culture, and gram staining on platelet centrifuged smears.

Results

Escherichia coli with 150 and 15 CFU per ml and *staphylococcus epidermidis* with 150 CFU per ml grew on culture medias after two days but *staphylococcus epidermidis* with 15 CFU per ml did after three days. The sensitivity rate of bacteria detection in platelet concentrates through gram staining was lower than quantitative culture. Despite lower plasma glucose level in platelet concentrates (as measured by hexokinase enzymatic method) inoculated with microbial stains, pH level in platelet concentrates (as measured by pH meter) contentiously increased during five days of storage.

Conclusions

The sensitivity rate of bacterial detection in platelet concentrates through measuring extra cellular pH was estimated to be higher than that of plasma glucose, culture and gram staining methods.

Key words: Platelet, Glucose, Culture techniques
SJIBTO 2008; 4(4): 265-274

Received: 14 Aug 2007

Accepted: 16 Jan 2008

Correspondence: Rahimkhani M., PhD of Microbiology. Tehran University of Medical Sciences.
P.O.Box: 4646, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88964009; Fax : (+9821)88964009
E-mail: rrahimkhani@sina.tums.ac.ir