



### مقاله های پژوهشی

- استفاده از روش CURB-60 و CRB-60 در تعیین پیش آگهی پنومونی اکتسای از جامعه‌ی سالمندان.....۱۴۹  
 دکتر علی اصغر فرازی، دکتر معصومه صوفیان، بنفشه نایب‌زاده
- بررسی ارتباط بین غلظت فلزات سنگین سرب و روی در خاک برخی اراضی استان اصفهان با بیماری مولتیپل اسکلروز ۱۶۰  
 الهام خسروی، دکتر مهران هودجی، دکتر مسعود اعتمادی فر
- مقایسه‌ی تعداد نسخه‌های درج شده‌ی ژن IP-10 با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی بر اساس سیستم ترانسپوزونی PiggyBac در ژنوم سلول‌های Human embryonic kidney.....۱۷۰  
 هادی میرزاپور، آرزو کرم‌زاده، دکتر حسین خان احمد، دکتر رسول صالحی، دکتر مجید خیرالهی
- بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های کریتیدیا در شهر اصفهان و حومه.....۱۸۲  
 دکتر منیر دودی، دکتر محبوبه سترکی، دکتر گیلدا اسلامی، دکتر سید حسین حجازی

### گزارش مورد

- کولیت ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس به همراه کولیت اولسراتیو؛ گزارش یک مورد نادر.....۱۹۴  
 دکتر رحمت اله رفیعی، نوید شریفی

### Original Articles

- Validity of Confusion, Uremia, Respiratory Rate, Blood Pressure, and Age  $\geq$  60 Years (CURB-60) and Confusion, Respiratory Rate, Blood Pressure, and Age  $\geq$  60 (CRB-60) in Determining the Prognosis of Community-Acquired Pneumonia in the Elderly.....159  
 Aliasghar Farazi MD, Masoomeh Sofian MD, Banafsheh Nayebzadeh
- The Relationship of Concentrations of Lead and Zinc and Multiple Sclerosis in Isfahan Province, Iran.....169  
 Elham Khosravi MSc, Mehran Houdaji PhD, Masoud Etemadifar MD
- Comparison of Inserted Mouse IP-10 Gene Copy Number in Helper-Dependent and Independent System Based on PiggyBac Transposition in Human Embryonic Kidney Cells.....181  
 Hadi Mirzapour, Arezo Karamzade, Hossein Khanahmad PhD, Rasoul Salehi PhD, Majid Kheirollahi PhD
- The Molecular Epidemiology of Crithidia Strains in Isfahan City and Surrounding Areas, Iran 193  
 Monir Doudi PhD, Mahbubeh Setorki PhD, Gilda Eslami PhD, Seyed Hossein Hejazi PhD
- Case Report
- Herpes Simplex Induced Colitis Complicating Ulcerative Colitis: A Case Report.....200  
 Rahmatollah Rafiei MD, Navid Sharifi



## مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۷۵)، بهمن چهارم فروردین ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

مدیر مسؤول: دکتر منصور شعله‌ور      سردبیر افتخاری: دکتر رویا کلیشادی

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

### ناشر:

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

E-mail: publications@mui.ac.ir

دفتر مجله: دانشکده پزشکی      صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶

مسئول دفتر: گلناز رجبی

دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۲۹۱

تلفن: ۰۳۱۱-۶۶۹۴۷۳۷

E-mail: jims@med.mui.ac.ir

<http://www.journals.mui.ac.ir/jims>

وب سایت مجله:

### امور نشر:

(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)

شرکت فرزانتگان راداندیش

اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵

تلفن و دورنگار: ۰۳۱۱-۶۶۸۶۳۰۲

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

تیراژ: ۵۰۰ نسخه

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

- Scopus
- Chemical Abstracts
- Islamic World Science Citation Center (ISC)
- Academic Search Complete EBSCO Publishing databases
- WHO/EMRO/Index Medicus
- Google Scholar
- Index Copernicus
- Directory of Open Access Journal (DOAJ)
- Index Academicus
- Scientific Information Database (www.sid.ir)
- www.iranmedex.com

کپی‌رایت: چاپ مطالب مندرج در این مجله به شرط ذکر منبع مجله بلامانع است.

تصاویر رنگی مقالات و کلیپ‌های ویدئویی بر روی وب سایت مجله قابل دسترسی می‌باشند

## اعضای شورای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان (به ترتیب حروف الفبا)

نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی
۱- دکتر مجتبی ابطحی	دانشیار، متخصص گوش و حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دکتر ابراهیم اسفندیاری	استاد، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دکتر محمد اسماعیل اکبری	استاد، فوق تخصص جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دکتر فرامرز اسماعیل بیگی	استاد، متخصص داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، آمریکا
۵- دکتر افسون امامی	دانشیار، فوق تخصص نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- شاهین امامی	گروه بیوشیمی و غدد داخلی، بیمارستان سن آنتونیو، فرانسه
۷- دکتر علیرضا امامی	دانشیار، متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۸- دکتر بابک امرا	استاد، فوق تخصص ریه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۹- دکتر رضا امین	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۱۰- دکتر کن باست	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۱۱- دکتر رضا باقریان سرارودی	استادیار، متخصص روانشناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۲- دکتر مجید برکتین	دانشیار، متخصص روانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۳- فرزین پور فرزاد	گروه زیست شناسی سلولی و ژنتیک، دانشگاه اراسموس، روتردام، هلند
۱۴- دکتر مسعود پورمقدس	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۵- دکتر احمد چیت‌ساز	دانشیار، متخصص داخلی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۶- دکتر مینا حسن رضایی	متخصص نورو ایمنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، آمریکا
۱۷- دکتر سید مرتضی حیدری	دانشیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۸- دکتر بهناز خانی	دانشیار، متخصص زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۹- دکتر مجید خزاعی	دانشیار، متخصص فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۰- دکتر حسن رزمجو	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۱- دکتر رضا روزبهانی	استادیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۲- دکتر مسعود سهیلیان	استاد، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲۳- دکتر منصور شعله‌ور	دانشیار، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۴- دکتر محمدرضا صفوی	استادیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۵- دکتر خسرو عادل‌لی	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۲۶- دکتر سعید عندلیب	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لوئیس ویل، آمریکا
۲۷- دکتر غلامرضا عسکری	متخصص بیماری‌های پوستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۸- دکتر زیبا فرج‌زادگان	دانشیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۹- دکتر حمید فشارکی	دانشیار، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۰- دکتر مرجانه فولادی	دکترای پرستاری، دانشگاه فلوریدا، آمریکا
۳۱- دکتر علی قیصری	استاد، فوق تخصص جراحی قلب، کالیفرنیا، آمریکا
۳۲- دکتر منصور کارآموز	استاد، متخصص اورولوژی، کالیفرنیا، آمریکا
۳۳- دکتر رویا کلشادی	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۴- دکتر جعفر گلشاهی	دانشیار، فوق تخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۵- دکتر عزیز گهری	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	دانشیار، فوق تخصص آسیب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	دانشیار، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر هوشنگ معین	استاد، متخصص جراحی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۰- دکتر آتیه مغيثی	استاد، متخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، آمریکا
۴۱- دکتر مجید ملکی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴۲- دکتر محمدرضا نوربخش	دانشیار، متخصص فیزیوتراپی، آمریکا
۴۳- دکتر فریدون نوحی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴۴- دکتر علی محمد هنجنی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

## راهنمای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

- ۱- **اهداف و چشم انداز:** مجله دانشکده پزشکی اصفهان به صورت هفته‌نامه و تحت حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتشر می‌گردد.
- ۲- این مجله مقالات اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را منتشر می‌نماید و همچنین فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین را بر روی وب سایت مجله قرار می‌دهد.
- ۳- **پذیرش دست‌نوشته:** پذیرش دست‌نوشته‌ها و پیگیری‌های بعدی در این مجله فقط از طریق وب سایت اختصاصی آن به آدرس <http://www.journals.mui.ac.ir/jims> و پس از ثبت نام (Registration) در آن ممکن می‌باشد. همراه دست‌نوشته باید یک نامه تایپ شده (Covering letter) به سردبیر، شامل عنوان و اسامی نویسنده یا نویسندگان و اعلام این که این دست‌نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است و یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد، ارسال گردد.
- ۴- دست‌نوشته باید توسط نرم‌افزار MS Word در سایز A4 و فاصله خطوط دو برابر (Double Spaced) با حاشیه‌های ۲/۵ سانتی‌متری تهیه شوند. جداول بدون حاشیه خارجی و تصاویر در فرمت GIF و JPEG و در تعداد محدود باشند. ارسال مدارک با فرمت PDF به هیچ عنوان پذیرفته نیست.
- ۵- دست‌نوشته باید شامل صفحه عنوان، چکیده، مقدمه، روش‌ها، یافته‌ها، بحث، تقدیر و تشکر و منابع باشد. **صفحه عنوان:** این صفحه باید شامل عنوان کامل، عنوان مکرری، اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان و همچنین آدرس، تلفن، فاکس و پست الکترونیکی نویسنده مسؤول باشد. ذکر منابع مالی و اعتباری طرح پژوهشی در این صفحه ضروری است.
- ۶- **چکیده:** تمام مقالات اصلی باید دارای چکیده مقاله به دو زبان فارسی و انگلیسی با حداکثر ۲۵۰ کلمه باشد. چکیده باید شامل بخش‌های سابقه علمی موضوع، روش‌ها، یافته‌ها و بحث باشد. در پایان چکیده مقاله ۳-۵ کلمه کلیدی قرار می‌گیرد که تنها با استفاده از راهنمای MESH در آدرس (<http://nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) استخراج گردند.
- ۷- **مقدمه و معرفی:** در این بخش اهداف و علل انجام مطالعه آورده می‌شود؛ بنابراین نیازی به ارائه گسترده مطالب موجود در متون علمی نیست. در این بخش باید از ارائه اطلاعات، یافته‌های و نتایج مطالعه خودداری گردد.
- ۸- **روش‌ها:** این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط منبع آن ذکر گردد اما اگر روشی نوین است، باید به صورتی توضیح داده شود که برای سایر محققان قابل درک و به طور عینی قابل انجام و تکرار باشد. در صورت استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص باید نام، نام کارخانه سازنده و آدرس آن در پرانتز ذکر گردد. اگر از دارو در مطالعه استفاده شده است باید نام ژنریک، دوز و روش مصرف آن آورده شود. در مورد افراد و بیماران تحت مطالعه باید جنس و سن (همراه انحراف معیار) آورده شود. در مورد نرم‌افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد. در صورتی که مطالعه دارای پرسش‌نامه یا چک لیست است، ضمیمه کردن آن لازم است؛ در مورد پرسش‌نامه‌های استاندارد ذکر نام و مرجع آن کافی است.
- ۹- **یافته‌ها:** این بخش به صورت متن همراه با جدول‌ها، شکل‌ها و نمودارها ارائه می‌گردد. محتوای جداول نباید به صورت کامل در متن ارائه شوند، بلکه کافی است با ذکر شماره جدول، شکل و یا نمودار به آنها اشاره شود. جدول‌ها، نمودارها و شکل‌ها هر کدام باید در یک صفحه جداگانه و پس از منابع، در پایان دست‌نوشته آورده شوند. در این بخش فقط یافته‌ها ارائه می‌شود و باید از ذکر دلایل و استدلال‌های مرتبط با آن خودداری گردد.
- ۱۰- **بحث:** در این بخش در ابتدا به یافته‌های مهم اساسی مطالعه و سپس تشابه و تفاوت‌های آن با یافته‌های سایر پژوهشگران در مطالعات مشابه اشاره می‌گردد. ذکر جزئیات کامل یافته‌ها در این بخش لازم نیست. تأکید بر یافته‌های جدید و با اهمیت مطالعه حاضر و دستاوردهای آن در این قسمت ضروری است. ذکر این که فرضیه ارائه شده در مطالعه صحیح یا نادرست بوده، یا این که دلایل کافی برای رد یا قبول آن به دست نیامده است، ضروری می‌باشد. هدف این بخش، ذکر دلیل اصلی انجام تحقیق، تحلیل و تفسیر یافته‌ها و همچنین نتیجه‌گیری کلی (Conclusion) است.

۱۱- **تقدیر و تشکر:** تمام افرادی که به نحوی در انجام مطالعه نقش داشته ولی جزء نویسندگان نبوده‌اند باید در این بخش مورد تقدیر قرار گیرند؛ از جمله کسانی که کمک‌های فنی، نوشتاری و مالی داده و همچنین سرپرستان و مدیران بخش‌های محل انجام مطالعه که در امر پشتیبانی‌های عمومی در اجرای تحقیق فعالیت داشته‌اند.

۱۲- **جدول‌ها:** تعداد محدود جدول با توجه به حجم مطالعه و مقاله، همراه با ذکر عنوان آن در بالای جدول مورد قبول خواهد بود. ارسال جداول فقط تحت نرم‌افزار MSWord مورد قبول است. توضیحات اضافی در خصوص محتوای جداول باید به صورت پی‌نوشته و در پایین جدول باشد. جدول‌ها باید در صفحات جداگانه و در پایان دست نوشته (پس از منابع) قرار داده شوند.

۱۳- **شکل‌ها:** تعداد محدود شکل همراه ذکر عنوان آن در زیر شکل یا نمودار و با فرمت GIF و JPEG قابل قبول است. اطلاعات موجود در شکل‌ها یا نمودارها نباید به طور کاملاً مشابه در جدول‌ها و یا متن مقاله ذکر شده باشند.

۱۴- **منابع:** نویسنده باید از صحت اشاره منابع ذکر شده به مطالب مورد استناد مطمئن باشد. ساختار منابع در این مجله بر اساس *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Bio Medical Journals (ICMJE)* و معاهده ونکوور (Vancouver) می‌باشد. تمامی منابع باید به زبان انگلیسی باشد، ترجمه متن منابع فارسی به عهده نویسنده است و در پایان آن عبارت [Persian] خواهد آمد. موارد ذیل برای نمونه ذکر می‌گردد:

#### **اگر منبع مورد نظر مقاله است:**

نام خانوادگی نویسنده، حرف اول نام کوچک نویسنده، عنوان مقاله، مخفف نام مجله (بر اساس Medline)، سال انتشار، شماره‌ی انتشار، شماره‌ی مجله، شماره‌ی صفحات. مثال:

(EN): Inzer N. Treatment of calcific aortic stenosis. Am J Cardiol 1987; 59(6): 314-7.

(FA): Zini F, Basiri Jahromi Sh. Study of fungal infections in patients with leukemia. Iranian journal of public health 1994; 1(4):89-103.[Persian].

(چنانچه تعداد نویسندگان ۶ نفر یا کمتر باشد، ذکر اسامی آن‌ها ضروری است. اگر تعداد آن‌ها ۷ نفر یا بیشتر باشد، پس از ۶ نفر، عبارت "et al." استفاده شود.)

#### **اگر منبع مورد نظر کتاب است:**

نام خانوادگی و حرف اول نام کوچک نویسنده (نویسندگان). عنوان کتاب. نوبت چاپ. محل نشر؛ نام ناشر؛ سال انتشار. p. شماره صفحات (نام نویسندگان با علامت کاما از هم جدا شود). مثال:

(EN): Romenes GJ. Cunningham's manual. 15<sup>th</sup> ed. New York: Oxford Univ Press; 1987.p.43-5.

(FA): Azizi F, Janghorbani M, Hatami H. Epidemiology and control of common disorders in Iran. 2<sup>nd</sup> ed. Tehran: Eshtiagh Publication; 2000.p.558.[Persian].

#### **اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:**

نام خانوادگی و حرف اول نام کوچک نویسنده (نویسندگان) آن فصل. عنوان فصل مورد نظر. در: نام خانوادگی و حرف اول نام تدوین کننده‌ی کتاب. عنوان کتاب. نوبت چاپ. محل نشر؛ نام ناشر؛ سال انتشار. p. صفحات. مثال:

(EN): Bodly L, Bailey Jr. Urinary tract infection. In: Tailor R, editor. Family medicine. 6<sup>th</sup> ed. New York: Springer; 2003.p. 807-13.

۱۵- **نمونه‌خوانی (Proofreading):** یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده مسؤوّل ارسال می‌گردد که لازم است در کوتاه‌ترین زمان تغییرات مورد نظر مجله انجام داده، از طریق وبسایت مجله ارسال نماید.

۱۶- **اختصارات و نشانه‌ها:** تنها از اختصارات و نشانه‌های استاندارد استفاده شود و از ذکر عبارات‌های مخفف در عنوان و خلاصه مقاله خودداری گردد.

۱۷- توضیح کامل در مورد هر کدام از عبارتهای اختصاری برای اولین بار در متن آورده شود، مگر این که مربوط به مقیاس‌ها و مقادیر استاندارد شناخته شده باشد.

۱۸- پس از چاپ، یک نسخه از مجله برای نویسنده مسؤوّل ارسال خواهد شد.

- ۱۹- **ملاحظات اخلاقی:** این ملاحظات باید در بخش روش‌ها اشاره گردند. اخذ رضایت‌نامه از کلیه‌ی افراد بالغ شرکت‌کننده در مطالعه ضروری است و در مورد کودکان و افراد تحت تکفل باید از ولی قانونی آنها اخذ شود. ذکر منبع تأییدکننده‌ی ملاحظات اخلاقی مطالعه لازم است. هنگام استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ذکر رعایت و مقررات استاندارد مربوط لازم است.
- ۲۰- **تداخل منافع (Conflict of Interest):** نویسنده یا نویسندگان باید هر گونه ارتباط مالی مانند دریافت هزینه، حق‌الزحمه، مواد و تجهیزات از دانشگاه‌ها، سازمان‌ها، نهادها، شرکت‌ها و سایر منابع که انتشار یافته‌های مطالعه می‌تواند به آنها سود یا زیان برساند را اعلام نمایند.
- ۲۱- **هزینه چاپ:** هیچ‌گونه هزینه‌ای برای چاپ مقالات در این مجله دریافت نمی‌شود.
- ۲۲- **حق نسخه‌برداری (Copyright):** تمامی محتویات مجله دانشکده پزشکی اصفهان تحت قانون حق نسخه‌برداری بین‌المللی قرار دارد. این مجله برای استفاده غیر تجاری در اختیار افراد قرار می‌گیرد. اصلاح، انتشار، انتقال و نمایش هر گونه محتویات مجله بدون ذکر نام این مجله ممنوع است.
- ۲۳- **فرآیند مرور دقیق (Peer Review):** تمام دست‌نوشته‌ها توسط حداقل ۳ نفر از داوران منتخب شورای نویسندگان مجله مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. نویسنده‌ی مسؤؤل در کوتاه‌ترین زمان در جریان تصمیم‌سردبیر در مورد رد، قبول یا اصلاحات مورد نظر داوران و هیأت تحریریه قرار خواهد گرفت. در صورت پذیرش مقاله برای چاپ، نامه پذیرش به همراه ایمیل برای نویسنده‌ی مسؤؤل ارسال می‌شود و مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت.
- ۲۴- هیأت تحریریه در رد، اصلاح، ویرایش و خلاصه کردن مقاله آزاد است.
- ۲۵- مسؤولیت صحت یا سقم مطالب ارائه شده در مقاله بر عهده‌ی نویسنده یا نویسندگان است.

## فهرست مطالب

### مقاله‌های پژوهشی

استفاده از روش CURB-۶۰ و CRB-۶۰ در تعیین پیش‌آگهی پنومونی اکتسابی از جامعه‌ی سالمندان.....۱۴۹  
دکتر علی اصغر فرازی، دکتر معصومه صوفیان، بنفشه نایب‌زاده

بررسی ارتباط بین غلظت فلزات سنگین سرب و روی در خاک برخی اراضی استان اصفهان با بیماری مولتیپل اسکلروز.....۱۶۰  
الهام خسروی، دکتر مهراں هودجی، دکتر مسعود اعتمادی فر

مقایسه‌ی تعداد نسخه‌های درج شده‌ی ژن IP-۱۰ با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی بر اساس سیستم ترانسپوزونی PiggyBac در ژنوم سلول‌های Human embryonic kidney.....۱۷۰  
هادی میرزاپور، آرزو کرم‌زاده، دکتر حسین خان احمد، دکتر رسول صالحی، دکتر مجید خیرالهی

بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های کریتیدا در شهر اصفهان و حومه.....۱۸۲  
دکتر منیر دودی، دکتر محبوبه سترکی، دکتر گیلدا اسلامی، دکتر سید حسین حجازی

### گزارش مورد

کولیت ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس به همراه کولیت اولسراتیو؛ گزارش یک مورد نادر.....۱۹۴  
دکتر رحمت اله رفیعی، نوید شریفی

## استفاده از روش CURB-۶۰ و CRB-۶۰ در تعیین پیش‌آگهی پنومونی اکتسابی از جامعه‌ی سالمندان

دکتر علی اصغر فرازی<sup>۱</sup>، دکتر معصومه صوفیان<sup>۲</sup>، بنفشه نایب‌زاده<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** با توجه به افزایش میزان مرگ و میر ناشی از پنومونی در افراد سالمند، استفاده از مدل ساده‌تر برای تعیین پیش‌آگهی پنومونی می‌تواند به کاهش میزان مرگ و میر در این گروه سنی بیانجامد. هدف این مطالعه، تعیین اعتبار مدل CURB-۶۰ (Confusion, uremia, respiratory rate, blood pressure, and age  $\geq 60$  years) و مدل CRB-۶۰ (Confusion, respiratory rate, blood pressure, and age  $\geq 60$  years) و مقایسه‌ی آن با مدل‌های PSI (Pneumonia severity index) و CRB-۶۵ و CURB-۶۵ بود.

**روش‌ها:** این مطالعه یک مطالعه‌ی توصیفی-مقطعی بود که در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی اراک به انجام رسید. اطلاعات ۱۴۱ بیمار ۶۰ سال و بالاتر مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه که دارای شرایط ورود به مطالعه بودند، به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.  $P \leq 0/050$  معنی‌دار تلقی شد.

**یافته‌ها:** میانگین سنی بیماران  $76 \pm 68/9$  با میانگین  $65/0$  سال بود. ۷۶ بیمار (۵۳/۹ درصد) مذکر و نسبت جنسی مرد به زن  $1/17$  بود. ۷۱/۶ درصد بیماران ساکن شهر بودند. شایع‌ترین بیماری‌های همراه بیماری‌های قلبی-عروقی (۳۷/۶ درصد) بود. شایع‌ترین علامت رال و رونکای (۹۲/۲ درصد) و هیپوترمی یا هیپرترمی (۸۸/۷ درصد) بود. از نظر بهبودی روز سوم حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت مدل PSI (Pneumonia severity index) و CURB-۶۰ بیشتر از سایر مدل‌ها بود و از نظر بستری در ICU (Intensive care unit) تا روز چهاردهم و مرگ تا روز سی‌ام بیشترین ارزش اخباری مثبت مربوط به مدل CURB-۶۵ و CRB-۶۰ بود.

**نتیجه‌گیری:** برای تعیین شدت و پیش‌آگهی پنومونی اکتسابی از جامعه در سالمندان، می‌توان از مدل CURB-۶۰ و مدل CRB-۶۰ استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** پنومونی اکتسابی از جامعه، CURB-۶۰، CRB-۶۰، سالمندان

**ارجاع:** فرازی علی اصغر، صوفیان معصومه، نایب‌زاده بنفشه. استفاده از روش CURB-۶۰ و CRB-۶۰ در تعیین پیش‌آگهی پنومونی اکتسابی از جامعه‌ی سالمندان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۵): ۱۵۹-۱۴۹

#### مقدمه

کشورهای رو به توسعه و ۳-۴ درصد در کشورهای توسعه یافته متغیر است (۱-۳). بروز آن با سن ارتباط دارد و در دو طیف سنی کودکان و سالمندان بیشتر

پنومونی اکتسابی از جامعه یکی از علل شایع مرگ و میر بیماران است و میزان بروز آن ۲۰-۳۰ درصد در

- ۱- استادیار، گروه بیماری‌های عفونی و گرمسیری و مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های عفونی اطفال، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- ۲- دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی و گرمسیری و مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های عفونی اطفال، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- ۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

Email: dr.farazi@arakmu.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر علی اصغر فرازی



جدول (Patient outcome research team) PORT اول بار توسط Fine و همکاران ارائه شد (۱۱-۱۰) و مدل (Confusion, uremia, respiratory) CURB-65 مدلی که توسط انجمن توراسیک انگلستان و امریکا و انجمن بیماری‌های عفونی امریکا ارائه شد و مدل تعدیل شده‌ی آن یعنی (Confusion, respiratory) CRB-65 (rate, blood pressure, and age  $\geq$  65 years) به سایر مدل‌ها مطرح می‌باشند. و به خصوص مدل CURB-65 در اکثر منابع معتبر به عنوان مدل پذیرفته شده برای تعیین شدت و پیش‌آگهی پنومونی مطرح شده است (۱۶-۱۲).

هدف این مطالعه، تعیین اعتبار و ارزش مدل‌های پیش‌گفته در پنومونی سالمندان و دو مدل پیشنهادی CURB-60 و CRB-60 در افراد سالمند می‌باشد.

### روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه‌ی توصیفی بود که در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی اراک به انجام رسید. جامعه‌ی آماری مورد مطالعه، بیماران ۶۵ سال و بالاتر مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه بودند. در مجموع، ۱۵۰ بیمار با سن ۶۰ سال و بالاتر با تشخیص پنومونی حاد اکتسابی از جامعه وارد مطالعه شدند که در طی مطالعه، ۹ بیمار از مطالعه خارج شدند (۵ بیمار به دلیل انصراف از ادامه‌ی درمان و ترخیص با رضایت شخصی، ۲ بیمار به علت تشخیص آمبولی ریه، ۱ بیمار به علت سل در طی بستری و ۱ بیمار به علت تشخیص لوسمی لنفوسیتیک مزمن) و در نهایت ۱۴۱ بیمار مورد آنالیز نهایی قرار گرفتند. اطلاعات بیماران شامل داده‌های دموگرافیک و

دیده می‌شود. پنومونی در افراد سالمند چهار برابر بیشتر از افراد جوان است (۵-۴) و بر اساس بعضی مطالعات، پنومونی اکتسابی از جامعه چهارمین علت شایع مرگ و میر در این گروه سنی است (۷-۶) و با توجه به افزایش میانگین طول عمر و مسن شدن جمعیت، به نظر می‌رسد در طی سال‌های آینده، شاهد افزایش موارد پنومونی در سالمندان باشیم.

در کشور ما بخش عمده‌ای از بیماری‌های تنفسی را پنومونی تشکیل می‌دهد. تعیین عامل ایجاد پنومونی با وجود پیشرفت‌های اخیر، هنوز هم مشکل است و چندین روز طول می‌کشد تا ارگانیسم مسؤل شناسایی شود و در بسیاری از بیماران نیز اتیولوژی آن شناسایی نمی‌شود و حتی با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی پیشرفته فقط در ۴۵-۷۰ درصد موارد می‌توان عامل آن را شناسایی کرد (۹-۸). از این رو تصمیم کلینیکی برای درمان آنتی میکروبیال مناسب، می‌تواند بر میزان مرگ و میر و هزینه اثرگذار باشد که این مسأله به ویژه در افراد مسن اهمیت دارد. شناخت عواملی که سبب بدتر شدن پیش‌آگهی در پنومونی و به خصوص در سالمندان می‌شود، می‌تواند در تصمیم‌گیری صحیح در مورد بیماران مفید باشد. اگر چه در خصوص عوامل مؤثر در پیش‌آگهی در بیماران مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه، توصیف زیادی شده است؛ اما به بررسی این عوامل در سالمندان به طور اختصاصی کمتر پرداخته شده است.

تا به حال مدل‌های مختلفی برای تعیین شدت پنومونی و پیش‌آگهی آن پیشنهاد و به کار گرفته شده است که مهم‌ترین آن‌ها مدل شاخص شدت پنومونی PSI (Pneumonia severity index) که بر اساس

## یافته‌ها

میانگین سنی بیماران در این مطالعه  $68/9 \pm 7/6$  و میانه ۶۵ سال بود. ۷۶ بیمار (۵۳/۹ درصد مذکر و نسبت جنسی مرد به زن برابر ۱/۱۷) بود. ۷۱/۶ درصد بیماران ساکن شهر بودند. ۲۳/۴ درصد بیماران در زمان ابتلا، مصرف سیگار داشتند. بیماری‌های همراه به ترتیب شامل بیماری‌های قلبی - عروقی (۳۷/۶ درصد)، بیماری‌های نرولوژیک (۲۵/۵ درصد)، دیابت (۲۰/۶ درصد)، بیماری انسدادی ریه (۱۸/۴ درصد)، بیماری‌های کلیوی (۵ درصد) و بیماری‌های کبدی (۴/۳ درصد) بود. شایع‌ترین علامت رال و رونکای (۹۲/۲ درصد) و هپتوترمی یا هیپوترمی (۸۸/۷ درصد) بود. سرفه در ۷۹/۴ درصد، تنگی نفس در ۷۷/۳ درصد، دفع خلط در ۷۳/۱ درصد و درد سینه در ۴۱/۸ درصد بیماران مشاهده شد.

میانگین درجه‌ی حرارت  $38/5 \pm 1/2$ ، میانگین تعداد تنفس بیماران  $26/1 \pm 7/2$ ، میانگین ضربان قلب  $19/4 \pm 6/100$ ، میانگین فشار خون سیستولیک  $130/4 \pm 21/7$  و دیاستولیک  $17/2 \pm 73/5$  بود. ویژگی‌های پاراکلینیک بیماران، میزان خطر بر اساس مدل‌های مختلف، مقایسه‌ی سه پیامد بالینی (شامل بهبودی روز سوم، بستری در ICU (Intensive care unit) تا روز چهاردهم و تعداد مرگ تا روز سی‌ام) و مقایسه‌ی حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، میزان درست‌نمایی و AUC در جداول ۱ تا ۴ آمده است.

## بحث

در برخورد اولیه با بیمار مشکوک به پنومونی اکتسابی از جامعه تشخیص و تعیین پیش‌آگهی برای تعیین

تغییرات علائم بالینی و آزمایشگاهی (شامل CBC یا ESR, Complete blood count یا CRP, Erythrocyte sedimentation rate یا C-reactive protein و ABG یا Arterial blood gas) در روز شروع درمان، روز سوم، روز هفتم، روز چهاردهم و همچنین مرگ تا روز سی‌ام بود.

معیار ورود به مطالعه شامل بیمار ۶۰ ساله و بالاتر مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه و موافقت بیمار برای شرکت در مطالعه بود. اطلاعات بیماران توسط چک لیست جمع‌آوری و به تدریج وارد Data sheet گردید. در نهایت، داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از شاخص‌های آمار توصیفی، خلاصه و طبقه‌بندی گردید. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) و آنالیزهای معمول مطالعات توصیفی اعم از میانگین و انحراف معیار و فراوانی مطلق و نسبی مورد بررسی قرار گرفت و در تحلیل داده‌ها از آزمون‌های  $t$ ،  $\chi^2$  و محاسبه‌ی نسبت درست‌نمایی (Likelihood ratio) و آنالیز ROC (Receiver operating characteristic) و محاسبه‌ی سطح زیر منحنی ROC (AUC یا Area under curve) و حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی استفاده گردید و  $P < 0/050$  معنی دار در نظر گرفته شد.

این تحقیق مصوب کمیته‌ی پژوهشی و کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک به کد اخلاق شماره‌ی ۸-۱۳۷-۹۱ می‌باشد. در طی انجام پژوهش از کلیه‌ی بیماران جهت انجام پژوهش رضایت آگاهانه اخذ گردید و در کلیه‌ی مراحل تحقیق، مصوبات کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک رعایت گردید.

مهم‌ترین بخش از این مدیریت را تشکیل می‌دهد. در این مطالعه، میزان خطر به سه رتبه‌ی خطر کم، خطر متوسط و خطر زیاد تقسیم شد که در مدل PSI گروه‌های I، II و III به عنوان کم خطر، گروه IV با خطر متوسط و گروه V به عنوان خطر زیاد در نظر گرفته شد.

در مدل‌های CURB-65 و CURB-60 بیماران با نمرات 0 و 1 در گروه کم خطر، بیماران با نمره‌ی 2 در گروه خطر متوسط و بیماران با نمرات 3، 4 و 5 در گروه خطر زیاد قرار گرفتند. در مدل‌های CURB-60 و CRB-60 بیماران با نمرات 0 و 1 در گروه کم خطر، بیماران با نمره‌ی 2 در گروه خطر متوسط و بیماران با نمرات 3 و 4 در گروه خطر زیاد قرار گرفتند.

در مطالعه‌ی حاضر طبق مدل‌های PSI، CURB-65 و CRB-60 به ترتیب 19/2، 18/4 و 17/0 درصد در گروه خطر زیاد قرار گرفتند و طبق مدل پیشنهادی CURB-60 و CRB-60، به ترتیب 23/4 و 22/0 درصد در گروه با خطر زیاد قرار گرفتند. در مقایسه‌ی CURB-65 و CRB-60 از نظر بستری ICU تا روز چهاردهم ( $P = 0/321$ ) و بستری ICU تا روز سی‌ام، به لحاظ حساسیت و ویژگی تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $P = 0/953$  و  $P = 0/509$ ). میزان ارزش اخباری مثبت مدل CURB-60 برای بهبودی روز سوم 82/4 درصد، برای بستری در ICU تا روز چهاردهم 90 درصد و تعداد مرگ تا روز سی‌ام 83/3 درصد و میزان درست‌نمایی آن‌ها به ترتیب 3/14، 9/00 و 7/41 بود. همچنین سطح زیر منحنی ROC (AUC) به ترتیب 0/863، 0/941 و 0/971 بود.

مدیریت درست بیماری اهمیت دارد. در این راستا، تصمیم به درمان بیمار در منزل یا در بیمارستان

جدول 1. ویژگی‌ها و علائم پاراکلینیک بیماران

علائم پاراکلینیک	مقدار
علائم آزمایشگاهی	
O <sub>2</sub> Saturation (میانگین ± انحراف معیار)	63/5 ± 12/4
BUN (mg/dL) (میانگین ± انحراف معیار)	40/4 ± 8/1
WBC (X 10 <sup>9</sup> /L) (میانگین ± انحراف معیار)	14/1 ± 6/2
تعداد بیماران با CRP مثبت	13 (92/2)
نمای رادیولوژیک	
بینابینی	8 (5/7)
تعداد (درصد)	
ارتشاح آلوئولار	111 (78/7)
تعداد (درصد)	
ارتشاح آلوئولار + بینابینی	22 (15/6)
تعداد (درصد)	
ارتشاح چند لوبی	25 (17/7)
تعداد (درصد)	
مابع جنب	13 (9/2)

BUN: blood urea nitrogen; WBC: white blood cells  
CRP: C-reactive protein

جدول 2. میزان خطر بیماری بر اساس مدل‌های مختلف در کل

بیماران

میزان خطر	خطر کم	خطر متوسط	خطر زیاد
نوع مدل	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
مدل PSI	78 (55/3)	36 (25/5)	27 (19/2)
مدل CURB-65	67 (47/5)	48 (34/1)	26 (18/4)
مدل CRB-65	73 (51/8)	44 (31/2)	24 (17/0)
مدل CURB-60	53 (37/6)	55 (39/0)	33 (23/4)
مدل CRB-60	64 (45/4)	46 (32/6)	31 (22)

PSI: Pneumonia severity index; CURB-65: Confusion, uremia, respiratory rate, blood pressure, and age years  $\geq 65$   
CRB-65: Confusion, respiratory rate, blood pressure, and age years  $\geq 65$

جدول ۳. مقایسه‌ی سه پیامد بالینی در بیماران بر حسب مدل‌های مختلف تعیین پیش‌آگهی

مدل تخمین	پیامد	بیماران		تعداد مرگ تا روز سی‌ام	بستری ICU تا روز چهاردهم	تعداد مرگ تا روز سی‌ام
		تعداد (درصد)	بهبودی روز سوم			
مدل PSI	کم خطر	۷۸ (۵۵/۳)	۳۰ (۳۸/۵)	۰	۰	۰
	خطر متوسط	۳۶ (۲۵/۵)	۱۴ (۳۸/۹)	۲ (۵/۶)	۳ (۸/۳)	۲ (۵/۶)
	خطر شدید	۲۷ (۱۹/۲)	۲ (۷/۴)	۴ (۱۴/۸)	۷ (۲۵/۹)	۴ (۱۴/۸)
	مقدار P		۰/۰۰۷۹	۰/۰۰۴۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴۱
مدل CURB-65	کم خطر	۶۷ (۴۷/۵)	۲۸ (۴۱/۸)	۰	۰	۰
	خطر متوسط	۴۸ (۳۴/۱)	۱۵ (۳۱/۳)	۱ (۲/۱)	۱۱ (۲/۱)	۱ (۲/۱)
	خطر شدید	۲۶ (۱۸/۴)	۳ (۱۱/۵)	۵ (۱۹/۲)	۹ (۳۴/۶)	۵ (۱۹/۲)
	مقدار P		۰/۰۱۹۶	۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
مدل CRB-65	کم خطر	۷۳ (۵۱/۸)	۲۸ (۳۸/۴)	۰	۰	۰
	خطر متوسط	۴۴ (۳۱/۲)	۱۴ (۳۱/۸)	۱ (۲/۳)	۲ (۴/۶)	۱ (۲/۳)
	خطر شدید	۲۴ (۱۷/۰)	۴ (۱۶/۷)	۵ (۲۰/۸)	۸ (۳۳/۳)	۵ (۲۰/۸)
	مقدار P		۰/۱۴۳۳	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
مدل CURB-60	کم خطر	۵۳ (۳۷/۶)	۲۳ (۴۳/۴)	۰	۰	۰
	خطر متوسط	۵۵ (۳۹/۰)	۲۰ (۳۶/۴)	۲ (۳/۶)	۲ (۳/۶)	۲ (۳/۶)
	خطر شدید	۳۳ (۲۳/۴)	۳ (۹/۱)	۴ (۱۲/۱)	۸ (۲۴/۲)	۴ (۱۲/۱)
	مقدار P		۰/۰۰۳۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۴۴
مدل CRB-60	کم خطر	۶۴ (۴۵/۴)	۲۹ (۴۵/۳)	۰	۰	۰
	خطر متوسط	۴۶ (۳۲/۶)	۱۴ (۳۰/۴)	۱ (۲/۲)	۱ (۲/۲)	۱ (۲/۲)
	خطر شدید	۳۱ (۲۲/۰)	۳ (۹/۷)	۵ (۱۶/۱)	۹ (۲۹/۰)	۵ (۱۶/۱)
	مقدار P		۰/۰۰۲۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۸

PSI: Pneumonia severity index; CURB: Confusion, uremia, respiratory rate, blood pressure, and age

جدید را ۹۳ درصد اعلام کرد. در حالی که این مدل فقط ۳۹ درصد موارد مرگ را پیش‌بینی می‌کرد (۱۷)، Macfarlane مدل BTS را تغییر داد و چهار عامل Confusion، تعداد سلول سفید خون  $\leq 10000$  در میلی‌متر مکعب، فشار اکسیژن شریانی  $> 6/6$  کیلو پاسکال و اوره‌ی خون  $< 7$  میلی‌مول در لیتر را پیشنهاد کرد که دقت ۸۷ درصد داشت و ۵۰ درصد موارد مرگ را پیش‌بینی می‌کرد (۱۸).

انجمن ریه انگلستان (British thoracic society یا BTS) در سال ۱۹۸۲ اول بار روی عوامل مؤثر بر پیش‌آگهی پنومونی مطالعه کرد و مدلی را اعلام کرد که سه متغیر تعداد تنفس  $\leq 30$  در دقیقه، فشار خون دیاستولیک  $> 60$  میلی‌متر جیوه و اوره‌ی خون  $< 7$  میلی‌مول در لیتر را در نظر می‌گرفت. بعداً، انجمن ریه این مدل را اصلاح کرد و اختشاش (Confusion) را به جای اوره‌ی خون در مدل وارد کرد و دقت این مدل

جدول ۴. مقایسه حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی پیامد بالینی در بیماران بر حسب مدل‌های مختلف

AUC	درست‌نمایی +LR	ارزش اخباری منفی	ارزش اخباری مثبت	ویژگی	حساسیت	دقت مدل (نوع مدل (نمره))
						مدل PSI (IV > گروه)
۰/۸۵۳۱	۵/۲۵	۹۲/۶ (۷۴/۳-۹۸/۷)	۸۷/۵ (۶۰/۴-۹۷/۸)	۹۲/۶ (۷۴/۳-۹۸/۷)	۳۸/۹ (۲۳/۶-۵۶/۹)	بهبودی روز سوم
۰/۶۹۷۰	۳/۱۱	۶۲/۳ (۴۷/۹-۷۴/۹)	۷۰/۰ (۳۵/۴-۹۱/۹)	۹۱/۷ (۷۶/۴-۹۷/۸)	۲۵/۹ (۱۱/۹-۴۶/۶)	بستری ICU تا روز چهاردهم
۰/۶۳۸۳	۲/۶۷	۵۹/۶ (۴۵/۸-۷۲/۲)	۶۶/۷ (۲۴/۱-۹۴/۰)	۹۴/۴ (۸۰/۰-۹۹/۰)	۱۴/۸ (۴/۹-۳۴/۶)	تعداد مرگ تا روز سی‌ام مدل CURB-65 (2 > نمره)
۰/۸۴۳۶	۲/۷۱	۴۱/۱ (۲۸/۴-۵۵/۰)	۸۳/۳ (۵۷/۷-۹۵/۶)	۸۸/۵ (۶۷/۷-۹۶/۹)	۳۱/۳ (۱۹/۱-۴۶/۴)	بهبودی روز سوم
۰/۹۴۱۳	۱۶/۶۲	۷۳/۴ (۶۰/۱-۸۳/۳)	۹۰/۰ (۵۴/۱-۹۹/۵)	۹۷/۹ (۸۷/۵-۹۹/۸)	۳۴/۶ (۱۷/۹-۵۵/۶)	بستری ICU تا روز چهاردهم
۰/۹۷۰۷	۹/۲۳	۶۹/۱ (۵۶/۶-۷۹/۵)	۸۳/۳ (۳۶/۵-۹۹/۱)	۹۷/۹ (۸۷/۵-۹۹/۸)	۱۹/۲ (۷/۳-۴۰/۰)	تعداد مرگ تا روز سی‌ام مدل CRB-65 (2 > نمره)
۰/۸۰۴۳	۱/۹۱	۴۰/۰ (۲۶/۷-۴۸/۱)	۷۷/۸ (۵۱/۹-۹۲/۶)	۸۳/۳ (۶۱/۸-۹۴/۵)	۳۱/۸ (۱۹/۱-۴۷/۷)	بهبودی روز سوم
۰/۹۲۱۶	۷/۳۳	۷۲/۴ (۵۸/۹-۸۲/۹)	۸۰/۰ (۴۴/۲-۹۶/۵)	۹۵/۴ (۸۳/۳-۹۹/۲)	۳۳/۳ (۱۶/۴-۵۵/۳)	بستری ICU تا روز چهاردهم
۰/۹۶۰۷	۹/۱۷	۶۹/۴ (۵۶/۲-۸۰/۱)	۸۳/۳ (۳۶/۵-۹۹/۱)	۹۷/۷ (۸۶/۵-۹۹/۸)	۲۰/۸ (۷/۹-۴۲/۷)	تعداد مرگ تا روز سی‌ام مدل CURB-60 (2 > نمره)
۰/۸۴۳۶	۴/۰۰	۴۶/۲ (۳۳/۹-۵۸/۹)	۸۶/۹ (۶۵/۳-۹۶/۵)	۹۰/۹ (۷۴/۵-۹۷/۶)	۳۶/۶ (۲۴/۱-۵۰/۱)	بهبودی روز سوم
۰/۹۵۱۱	۶/۷۰	۶۷/۹ (۵۶/۳-۷۷/۸)	۸۰/۰ (۴۲/۲-۹۶/۵)	۹۶/۴ (۸۶/۴-۹۹/۴)	۲۴/۲ (۱۱/۷-۴۲/۶)	بستری ICU تا روز چهاردهم
۰/۹۷۰۷	۳/۳۳	۶۴/۶ (۵۳/۲-۷۴/۷)	۶۶/۷ (۲۴/۱-۹۴/۰)	۹۶/۴ (۸۶/۴-۹۹/۴)	۱۲/۱ (۳/۹-۲۹/۲)	تعداد مرگ تا روز سی‌ام مدل CRB-60 (2 > نمره)
۰/۸۶۳۱	۳/۱۴	۴۶/۶ (۳۳/۸-۵۹/۹)	۸۲/۴ (۵۵/۸-۹۵/۳)	۹۰/۳ (۷۳/۱-۹۷/۵)	۳۰/۴ (۱۸/۲-۴۵/۹)	بهبودی روز سوم
۰/۹۴۱۱	۹/۰۰	۶۷/۲ (۵۴/۵-۷۷/۸)	۹۰ (۵۴/۱-۹۹/۵)	۹۷/۸ (۸۷/۰-۹۹/۸)	۲۹/۱ (۱۴/۹-۴۸/۲)	بستری ICU تا روز چهاردهم
۰/۹۷۰۷	۷/۴۱	۶۳/۴ (۵۱/۱-۷۴/۳)	۸۳/۳ (۳۶/۵-۹۹/۱)	۹۷/۸ (۸۷/۰-۹۹/۸)	۱۶/۲ (۶/۱-۳۴/۴)	تعداد مرگ تا روز سی‌ام

PSI: Pneumonia severity index; ICU: Intensive care unit; CURB: Confusion, uremia, respiratory rate, blood pressure, and age; AUC: Area under curve; LR: Likelihood ratio

پیشنهاد شد که متغیر سن بالای ۶۵ هم به مدل قبلی اضافه شد و در ۶ گروه با نمرات صفر تا پنج قرار می‌گرفت و در بررسی اولیه، میزان خطر مرگ در گروه با نمره صفر ۰/۷ درصد و در گروه‌های با نمرات ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۲/۳، ۳/۰، ۱۷/۰، ۴۲/۰ و ۵۷/۰ درصد گزارش گردید (۲۰-۲۳).

Fine و همکاران مدل PSI (Pneumonia Severity Index) را پیشنهاد نمودند و مرگ تا ۳۰ روز را به عنوان تعیین پیش‌آگهی در ۵ گروه در نظر گرفتند و میزان مرگ در گروه‌های I الی III

Neill و همکاران مدل اصلاح شده‌ی انجمن توراسیک انگلستان (Modified BTS rule) شامل Confusion و تعداد تنفس  $\leq 30$  در دقیقه و فشار دیاستولیک  $> 60$  میلی‌متر جیوه و اوره‌ی خون  $< 7$  میلی‌مول در لیتر را پیشنهاد کرد که در مقایسه با دو مدل BTS بهتر می‌توانست خطر مرگ را پیش‌بینی کند (۱۹). تا این که مدل CURB پیشنهاد شد که همان مدل Macfarlane بود و فقط فشار خون سیستولیک  $> 90$  میلی‌متر جیوه نیز در امتیاز فشارخون وارد شد. پس از آن مدل CURB-65

Capelastegui و همکاران در مطالعه‌ای سه مدل PSI، CURB-65 و CRB-60 را مقایسه کردند و اعلام نمودند که قدرت پیش‌بینی مرگ تا ۳۰ روز در هر سه مدل با روش آنالیز ROC به طور تقریبی مشابه بود (۲۹)، اما در مطالعه‌ی Aujesky و همکاران با آنالیز ROC قدرت پیش‌بینی مرگ تا ۳۰ روز در مدل PSI بیشتر از سایر مدل‌ها بود (۳۰)؛ البته ایراد مطالعه‌ی پیش‌گفته این بود که اکثر افراد مورد مطالعه در گروه خطر ۱ الی ۳ بودند و فقط ۶ درصد در گروه خطر ۴ قرار داشتند. در حالی که در مطالعه‌ی حاضر ۲۵/۵ درصد در گروه ۴ و ۱۹/۲ در گروه ۵ مدل PSI بودند.

در مطالعه‌ی Man و همکاران در هنگ کنگ برای مقایسه‌ی سه مدل فوق، بیماران به سه گروه کم خطر، خطر متوسط و خطر زیاد تقسیم شدند. میزان مرگ تا روز سی‌ام و بستری در ICU تا روز چهاردهم به ترتیب ۸/۶ درصد و ۴/۰ درصد بود و هر سه مدل دارای قدرت پیش‌بینی یکسانی بودند؛ در آنالیز ROC سطح زیر منحنی (AUC) برابر ۰/۷۳۶ بود (۳۱). در مطالعه‌ی Loh و همکاران در مالزی، مدل BTS مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این مدل قدرت پیش‌بینی کمی برای سنجش مرگ و میر دارد (۳۲).

### نتیجه‌گیری

بررسی مطالعات مختلف و همچنین مطالعه‌ی حاضر بیانگر این است که در تمام مدل‌های به کار رفته، افزایش میزان مرگ و میر با افزایش گروه‌های خطر زیادتر می‌شود؛ اما به نظر می‌رسد هر یک از مدل‌ها نواقصی هم دارند؛ به علاوه، مقایسه‌ی مطالعات در کشورهای مختلف بیانگر این است که مدل‌های فوق

کمتر از گروه‌های IV و V بود. نقش اولیه‌ی مدل PSI بیشتر در تعیین افراد با مرگ و میر پایین بود تا بتوان بیمارانی را که نیاز به بستری ندارند مشخص کرد (۲۴). بعضی مطالعات این مدل را برای تعیین مرگ و میر مناسب دانستند و بعضی محققین در بررسی خود مرگ و میر کمتر را در گروه‌های پرخطر به دست آوردند (۲۶-۲۵)؛ اما در مجموع، مدل PSI به عنوان مدلی موفق در پیش‌بینی خطر طولانی مدت (Long term outcome) مفید اعلام شد و امروزه انجمن بیماری‌های عفونی آمریکا آن را به عنوان یک مدل مناسب تعیین شدت پنومونی توصیه می‌کنند (۲۷، ۸).

یکی از محدودیت‌های این مدل، تأثیر نامتوازن امتیاز مربوط به سن بیمار است که منجر به تخمین پایین‌تر شدت پنومونی به ویژه در افراد جوان می‌شود (۲۳). در مطالعه‌ی امامی نائینی و همکاران در اصفهان در خصوص شدت پنومونی با مدل PSI در سالمندان با تشخیص پنومونی اکتسابی از جامعه، مشخص شد که میانگین نمره‌ی شدت پنومونی در این بیماران  $33/3 \pm 91/4$  با دامنه‌ی ۱۶۶-۱۹ بود که بر اساس آن، ۹ بیمار (۱۹/۱ درصد) در گروه I، ۷ بیمار (۱۴/۹ درصد) در گروه II، ۱۷ بیمار (۳۶/۲ درصد) در گروه IV و V و ۹ نفر (۱۴/۹ درصد) در گروه V قرار گرفتند. نیمی از بیماران مورد مطالعه که در بخش بیماری‌های عفونی بستری بودند، با در نظر گرفتن این سیستم نمره‌دهی می‌توانستند درمان سرپایی شوند. از طرف دیگر، حدود ۲۰ درصد از بیماران این مطالعه که در گروه V بودند، بر اساس این سیستم نمره‌دهی، اندیکاسیون بستری در بخش ICU را داشتند (۲۸).

اخباری مثبت و منفی، با سایر مدل‌ها قابل قیاس باشد و با سطح زیر منحنی ROC معادل ۰/۹۴۱ برای بستری و ۰/۹۷۱ برای مرگ تا روز ۳۰ دارای قدرت پیش‌بینی مطلوبی باشد. از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر، کم بودن حجم نمونه بود و پیشنهاد می‌شود مطالعات دیگری با حجم نمونه‌ی بیشتر و به صورت چند مرکز (Multi-center) انجام شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای پزشکی عمومی (خانم بنفشه نایب‌زاده) در دانشکده‌ی پزشکی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد که بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه جهت تأمین منابع مالی انجام طرح، قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از همکاری خوب سایر پزشکانی که بیماران را برای شرکت در این طرح ارجاع نمودند و بیماران شرکت کننده در طرح سپاس‌گزاری می‌گردد.

در جمعیت‌ها و گروه‌های سنی متفاوت، نتایج متفاوتی دارند و قدرت پیش‌بینی آن‌ها متفاوت خواهد بود (۲۹، ۲۴، ۲۰). از این رو به نظر می‌رسد بررسی اعتبار و دقت هر مدلی در جمعیت‌ها و نژادهای مختلف و حتی گروه‌های سنی مختلف ضرورت داشته باشد. از طرفی، یکی از ویژگی‌های خوب CURB-۶۵ سادگی آن است که با توجه به عدم امکان اندازه‌گیری سطح اوره‌ی خون در بعضی مراکز، مدل ساده‌تر شده‌ی آن یعنی CRB-۶۵ به کار رفت.

در این مطالعه، سعی شد مدلی که سادگی و روانی ارزیابی و قدرت بالای پیش‌بینی مدل‌های دیگر را داشته باشد، در جمعیت سالمند به کار گرفته شود. از این رو، مدل CURB-۶۰ و CRB-۶۰ برای این موضوع پیشنهاد می‌شود. به نظر می‌رسد با توجه به شرایط و امکانات مراکز درمانی و به ویژه برای اورژانس‌های پیش‌بیمارستانی و بیمارستانی، به کارگیری مدل CRB-۶۰ از اعتبار و دقت خوبی برخوردار باشد و از نظر حساسیت، ویژگی، ارزش

### References

1. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Huchon G, Ieven M, Ortqvist A, et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Eur Respir J* 2005; 26(6): 1138-80.
2. Hak E, Bont J, Hoes AW, Verheij TJ. Prognostic factors for serious morbidity and mortality from community-acquired lower respiratory tract infections among the elderly in primary care. *Fam Pract* 2005; 22(4): 375-80.
3. Kontou P, Kuti JL, Nicolau DP. Validation of the Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society criteria to predict severe community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Emerg Med* 2009; 27(8): 968-74.
4. Flannery MT, McCool MJ. Community-acquired pneumonia guidelines and resident behavior. *Am J Med* 2005; 118(8): 929-30.
5. Aleva RM, Boersma WG. Guideline 'Diagnosis and treatment of community-acquired pneumonia' from the Dutch Thoracic Society. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149(45): 2501-7.
6. Anevlavis S, Bouros D. Scoring systems in community acquired pneumonia. *Pneumon* 2009; 22(4): 286-9.
7. Espana PP, Capelastegui A, Gorordo I, Esteban C, Oribe M, Ortega M, et al. Development and validation of a clinical prediction rule for severe community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(11): 1249-56.
8. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus

- guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 (Suppl 2): S27-S72.
9. Chalmers JD, Singanayagam A, Hill AT. Predicting the need for mechanical ventilation and/or inotropic support for young adults admitted to the hospital with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 47(12): 1571-4.
  10. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336(4): 243-50.
  11. Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, Weissfeld L, Fine J, Welch RD, et al. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(11): 1242-7.
  12. Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T. CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia. *J Intern Med* 2006; 260(1): 93-101.
  13. Phua J, See KC, Chan YH, Widjaja LS, Aung NW, Ngerng WJ, et al. Validation and clinical implications of the IDSA/ATS minor criteria for severe community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009; 64(7): 598-603.
  14. Bont J, Hak E, Hoes AW, Macfarlane JT, Verheij TJ. Predicting death in elderly patients with community-acquired pneumonia: a prospective validation study reevaluating the CRB-65 severity assessment tool. *Arch Intern Med* 2008; 168(13): 1465-8.
  15. Donowitz GR, Mandell GL. Acute pneumonia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2009.
  16. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's principles of internal medicine*. 18<sup>th</sup> ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2011.
  17. Community-acquired pneumonia in adults in British hospitals in 1982-1983: a survey of aetiology, mortality, prognostic factors and outcome. The British Thoracic Society and the Public Health Laboratory Service. *Q J Med* 1987; 62(239): 195-220.
  18. Macfarlane JT. Adverse prognostic factors in pneumonia. *Thorax* 1983; 38(3): 231.
  19. Neill AM, Martin IR, Weir R, Anderson R, Cheresky A, Epton MJ, et al. Community acquired pneumonia: aetiology and usefulness of severity criteria on admission. *Thorax* 1996; 51(10): 1010-6.
  20. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* 2003; 58(5): 377-82.
  21. BTS Guidelines for the Management of Community Acquired Pneumonia in Adults. *Thorax* 2001; 56(Suppl 4): IV1-64.
  22. Lim WS, Lewis S, Macfarlane JT. Severity prediction rules in community acquired pneumonia: a validation study. *Thorax* 2000; 55(3): 219-23.
  23. Ewig S, de RA, Bauer T, Garcia E, Mensa J, Niederman M, et al. Validation of predictive rules and indices of severity for community acquired pneumonia. *Thorax* 2004; 59(5): 421-7.
  24. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336(4): 243-50.
  25. Ewig S, Kleinfeld T, Bauer T, Seifert K, Schafer H, Goke N. Comparative validation of prognostic rules for community-acquired pneumonia in an elderly population. *Eur Respir J* 1999; 14(2): 370-5.
  26. Roson B, Carratala J, Dorca J, Casanova A, Manresa F, Gudiol F. Etiology, reasons for hospitalization, risk classes, and outcomes of community-acquired pneumonia in patients hospitalized on the basis of conventional admission criteria. *Clin Infect Dis* 2001; 33(2): 158-65.
  27. Mortensen EM, Kapoor WN, Chang CC, Fine MJ. Assessment of mortality after long-term follow-up of patients with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003; 37(12): 1617-24.
  28. Emami Naini S, Emami Naini A, Shirani K, Mirzadeh F, Bagheri A. Assessment of pneumonia severity index in patients with community-acquired pneumonia admitted to Alzahra Hospital, Isfahan, Iran. *J Isfahan Med Sch* 2012; 30(182): 336-43. [In Persian].
  29. Capelastegui A, Espana PP, Quintana JM, Areitio I, Gorordo I, Egurrola M, et al. Validation of a predictive rule for the management of community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2006; 27(1): 151-7.
  30. Aujesky D, Auble TE, Yealy DM, Stone RA, Obrosky DS, Meehan TP, et al. Prospective comparison of three validated prediction rules for prognosis in community-acquired pneumonia. *Am J Med* 2005; 118(4): 384-92.
  31. Man SY, Lee N, Ip M, Antonio GE, Chau SS, Mak P, et al. Prospective comparison of three



- predictive rules for assessing severity of community-acquired pneumonia in Hong Kong. *Thorax* 2007; 62(4): 348-53.
32. Loh LC, Khoo SK, Quah SY, Visvalingam V, Radhakrishnan A, Vijayasingham P, et al. Adult community-acquired pneumonia in Malaysia: prediction of mortality from severity assessment on admission. *Respirology* 2004; 9(3): 379-86.
33. Buising KL, Thursky KA, Black JF, MacGregor L, Street AC, Kennedy MP, et al. A prospective comparison of severity scores for identifying patients with severe community acquired pneumonia: reconsidering what is meant by severe pneumonia. *Thorax* 2006; 61(5): 419-24.

## Validity of Confusion, Uremia, Respiratory Rate, Blood Pressure, and Age $\geq$ 60 Years (CURB-60) and Confusion, Respiratory Rate, Blood Pressure, and Age $\geq$ 60 (CRB-60) in Determining the Prognosis of Community-Acquired Pneumonia in the Elderly

Aliasghar Farazi MD<sup>1</sup>, Masoomeh Sofian MD<sup>2</sup>, Banafsheh Nayebzadeh<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Due to high rates of mortality from pneumonia in the elderly, using a simple model for determining the prognosis of pneumonia can lead to a decrease in the mortality rate in this group. This study aimed to determine the validity of confusion, uremia, respiratory rate, blood pressure, and age  $\geq$  60 years (CURB-60) and confusion, respiratory rate, blood pressure, and age  $\geq$  60 (CRB-60) models in determining the prognosis of community-acquired pneumonia in the elderly and comparison them with models of the pneumonia severity index (PSI), CURB-65, and CRB-65.

**Methods:** This cross-sectional study was conducted in 2013 in Arak University of Medical Sciences, Iran. Data of 141 patients with the age of 60 years and older with community-acquired pneumonia who had inclusion criteria were included in the study and analyzed. P-value  $<$  0.05 was considered significant.

**Findings:** The mean age of patients was  $68.9 \pm 7.6$  with the median of 65.0 years. 76 patients (53.9%) were men and sex ratio of men/women was 1.17. 71.6% of patients were in urban areas. The most common comorbidity was cardiovascular disease (37.6%) and the most common sign and symptom were respiratory rate (92.2%), hypothermia or hyperthermia (88.7%), respectively. Sensitivity, specificity and positive predictive value of PSI and CURB-60 model for third day recovery were higher than the other models. The highest positive predictive value of intensive care unit (ICU) admission until the fourteenth day and 30-day mortality were in the models of CURB-65 and CRB-60.

**Conclusion:** To determine the severity and prognosis of community-acquired pneumonia in the elderly, CURB-60 and CRB-60 models can be used.

**Keywords:** Community-acquired pneumonia, Confusion, uremia, respiratory rate, blood pressure, and age  $\geq$  60 years (CURB-60), Confusion, respiratory rate, blood pressure, and age  $\geq$  60 (CRB-60), Elderly

**Citation:** Farazi A, Sofian M, Nayebzadeh B. **Validity of Confusion, Uremia, Respiratory Rate, Blood Pressure, and Age  $\geq$  60 Years (CURB-60) and Confusion, Respiratory Rate, Blood Pressure, and Age  $\geq$  60 (CRB-60) in Determining the Prognosis of Community-Acquired Pneumonia in the Elderly.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(275): 149-59

1- Assistant Professor, Department of Infectious Disease and Tuberculosis AND Pediatric Infectious Research Center, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Associate Professor, Department of Infectious Disease and Tuberculosis AND Pediatric Infectious Research Center, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Student of Medicine, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

**Corresponding Author:** Aliasghar Farazi MD, Email: dr.farazi@arakmu.ac.ir

## بررسی ارتباط بین غلظت فلزات سنگین سرب و روی در خاک برخی اراضی استان اصفهان با بیماری مولتیپل اسکلروز

الهام خسروی<sup>۱</sup>، دکتر مهران هودجی<sup>۲</sup>، دکتر مسعود اعتمادی فر<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** بیماری مولتیپل اسکلروز (MS یا Multiple sclerosis) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مغز و اعصاب است و اغلب در بالغین جوان بروز می‌کند. این بیماری از نظر بالینی با درگیری قسمت‌های مختلف سیستم اعصاب مرکزی در زمان‌های مختلف مشخص می‌گردد. هنوز علت مشخصی برای بروز این بیماری به دست نیامده است. این تحقیق با هدف کشف ارتباط احتمالی بین این بیماری و عوامل محیطی با بهره‌گیری از سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS یا Geographic information system) انجام شد.

**روش‌ها:** در این تحقیق مناطق مورد مطالعه چند شهرستان از غرب استان اصفهان (نجف‌آباد، مبارکه و لنجان) بودند. چندین نمونه از خاک هر منطقه برداشت شد و برای اندازه‌گیری عناصر سرب و روی و انجام آنالیز مورد نظر به آزمایشگاه انتقال داده شد. غلظت فلزات انتخابی با اسپکتروفتومتری جذب اتمی مدل (Pye unicam spq) اندازه‌گیری شد. همچنین آمار بیماری MS طی سال‌های ۹۱-۱۳۸۷ از مرکز بهداشت استان اصفهان تهیه گردید و خون ۱۵ نفر از بیماران مورد آزمایش فلزات سنگین قرار گرفت، سپس به کمک نرم‌افزار GIS نقشه‌های پراکنده‌ی مواد و بیماری ترسیم شد.

**یافته‌ها:** بخش مهمی از بیماری MS منطبق با پراکنده‌ی سرب در مناطق مورد مطالعه بود؛ اما بیماری ارتباط چندانی با پراکنده‌ی روی نداشت.

**نتیجه‌گیری:** ترسیم نقشه‌ی بیماری MS نشان داد که مناطق با شیوع بالای بیماری منطبق با بالا بودن آلودگی‌هایی نظیر سرب است و این انطباق، ارتباط بیماری با عوامل و آلودگی‌های محیطی را تبیین می‌نماید.

**واژگان کلیدی:** بیماری مولتیپل اسکلروز، آلودگی‌های محیطی، شیوع

**ارجاع:** خسروی الهام، هودجی مهران، اعتمادی فر مسعود. بررسی ارتباط بین غلظت فلزات سنگین سرب و روی در خاک برخی اراضی

استان اصفهان با بیماری مولتیپل اسکلروز. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۵): ۱۶۹-۱۶۰

می‌سازد و منجر به ایجاد ضایعاتی موسوم به اسکلروز در مغز و یا نخاع می‌شود؛ به همین دلیل، به این بیماری اسکلروز متعدد گفته می‌شود. MS در شهرهای صنعتی و در کنار کارخانه‌های آلوده کننده‌ی آب و هوا بسیار شایع‌تر است. این مسأله در بسیاری

### مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروز (MS یا Multiple sclerosis) یک بیماری ناهمگون و مادام‌العمر می‌باشد که مناطق متعددی از سیستم اعصاب مرکزی (ماده سفید مغز و نخاع) را درگیر

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه خاک‌شناسی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه خاک‌شناسی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه بیماری‌های اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

سن، ژنتیک، مسایل اجتماعی - اقتصادی و صنعت در این زمینه نقش دارند.

این بیماری بسیار ناتوان کننده است و به همین علت، تلاش برای پیدا نمودن علل به وجود آورنده‌ی بیماری می‌تواند راهکاری برای کاهش یا سرکوب بیماری به شمار رود و جامعه‌ی پزشکی به جای پرداختن به موضوع درمان، می‌بایست موضوع پیشگیری را مد نظر قرار دهند و با تشریک مساعی با علوم دیگر علل احتمالی بیماری را کشف نماید (۲). یکی از اساسی‌ترین مسایل در ارتباط با فلزات سنگین، عدم متابولیزه شدن آن‌ها در بدن می‌باشد (۳).

در تحقیقات انجام شده در انگلیس، مشاهده شد که با وجود ضرورت عنصر آهن برای عمل طبیعی سلول‌ها و آنزیم‌ها در انسان، مقدار زیاد آهن باعث اختلال و ایجاد بیماری MS می‌شود. حتی دیده شد که مقدار آلومینیوم و آهن در ادرار بیماران مبتلا به MS دارای غلظت بیشتری نسبت به افراد سالم است (۴).

در کشور کانادا مقدار سرب، جیوه و کادمیم توسط سازمان بررسی بهداشت کانادا در ۱۵ منطقه، مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی از خون و ادرار ۵۰۰۰ نفر پس از بررسی وضعیت سلامت کنونی، محیط زیست و سبک زندگی طی دو سال نمونه‌برداری شد. آزمایش‌ها نشان داد که با افزایش سن افراد، مقدار جذب و تجمع این عناصر توسط بدن افزایش می‌یابد که می‌تواند حاصل از محل کار و زندگی و یا مواد غذایی باشد (۵).

هودجی و جلالیان در تحقیق انجام شده برای تعیین پراکنش نیکل، منگنز و کادمیم در خاک و

کشورها صادق است. اصفهان نیز آلوده‌ترین شهر صنعتی ایران است و از نظر غلظت مواد سمی و خطرناک در آب، خاک و هوا رتبه‌ی بالایی را در کشور دارد و بیماری در شهرهای مستقر در حاشیه‌ی زاینده‌رود و مجاورت کارخانجات آلوده کننده، شیوع بیشتری دارد. به نظر می‌رسد این آلودگی‌های صنعتی و مواد سمی موجود در آب و هوا در طی سال‌های اخیر منجر به بروز تغییرات ژنتیکی متعددی گردیده‌اند و با تأثیر مستقیم بر روی سیستم ایمنی و تغییر عملکرد سلول‌های ایمنی به تدریج زمینه را برای بروز MS در یک فرد آماده نموده‌اند. آلودگی‌های صنعتی در یک جامعه فاجعه‌ای عظیم است؛ چرا که همه‌ی افراد از کوچک و بزرگ در معرض مستقیم این مواد صنعتی هستند و نقش آسیب رساننده‌ی آن‌ها به بافت‌های بدن به خصوص سیستم عصبی و نیز تغییرات ژنتیکی، به طور کامل اثبات شده است.

Fulgenzi و همکاران در تحقیق انجام شده در ایتالیا، با حذف فلزات سنگین در بدن بیماران توسط روش درمانی (Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA، بهبود بیماری MS را مشاهده کردند (۱). این تغییرات ژنتیکی ممکن است در سال‌های بعد و نسل‌های آینده نیز خطرزا باشد. مولتیپل اسکروز بیش از ۱ میلیون نفر را در سراسر جهان مبتلا می‌نماید که درگیری زنان دو برابر مردان است. در بعضی بیماران، MS یک بیماری خفیف است، اما برای دیگران منجر به ناتوانی می‌شود. اگر چه فرضیاتی در زمینه‌ی نقش ویروس‌ها به عنوان عامل بروز MS موجود است، اما مجموعه‌ای از عوامل مانند نژاد، عوامل جغرافیایی، آلودگی‌های محیطی،

تمامی موجودات زنده است. بعضی از عوارض نامطلوب آن عبارت از مسمومیت، تهوع، استفراغ و اسهال است که در اثر مصرف نوشیدنی‌های اسیدی یا غذاهایی که در ظروف گالوانیزه تهیه و نگهداری می‌شوند، به وجود می‌آید (۹).

هدف این مطالعه، بررسی ارتباط بین غلظت برخی از فلزات سنگین در اراضی استان اصفهان با بیماری مولتیپل اسکروز بود.

### روش‌ها

برای انجام این تحقیق ابتدا به جمع‌آوری و مطالعه منابع علمی و کاربردی موجود در این زمینه اقدام گردید. اطلاعات بیماری از مرکز بهداشت استان اصفهان تهیه شد. سپس، ۱۵ نفر از بیماران به منظور بررسی میزان فلزات سنگین سرب و روی در خون مورد آزمایش قرار گرفتند، پس از آن از ۱۵ نقطه در شهرستان‌های مورد نظر نمونه از سطح خاک برداشت شد و برای اندازه‌گیری عناصر سرب و روی و انجام آنالیز موردنظر به آزمایشگاه انتقال داده شد. غلظت فلزات انتخابی با اسپکتروفتومتر جذب اتمی مدل (Pye unicam spq) اندازه‌گیری شد. همچنین آمار بیماری مولتیپل اسکروز طی سال‌های ۹۱-۸۷ از مرکز بهداشت استان اصفهان تهیه گردید. نقشه‌ی پراکندگی مواد و بیماری با استفاده از نرم‌افزار سیستم اطلاعات جغرافیایی (Geographic information system یا GIS) ترسیم شد.

### یافته‌ها

جامعه‌ی آماری شامل ۶۷۴۹ نفر بیمار مبتلا به MS در شهرستان‌های نجف‌آباد، مبارکه و لنجان بود. دوره‌ی

محصولات کشاورزی در منطقه استقرار فولاد مبارکه، مشاهده کرد که حداکثر غلظت نیکل و منگنز قابل استخراج با DTPA در شمال شرق منطقه و در لایه‌ی ۰-۵ سانتی‌متری خاک بوده است (به ترتیب ۴/۲ و ۳۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک). غلظت این دو عنصر در لایه‌های ۵-۱۰، ۱۰-۲۰ و ۲۰-۴۰ سانتی‌متری خاک کاهش یافت (به ترتیب ۲/۷، ۲/۷، ۲/۱، ۲۰۰، ۲۱۲، ۱۴۶ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک). غلظت نیکل و کادمیم در اندام‌های هوایی محصولات کشاورزی منطقه در حد تشخیص دستگاه جذب اتمی نبود، اما غلظت منگنز در اندام هوایی برنج ۷۱۶/۶ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک گیاهی بود که در مقایسه با استاندارد آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (حدود ۱۰۰-۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده‌ی خشک گیاهی) بالا بوده است (۶).

هودجی و افیونی در تحقیق انجام شده برای تعیین اثر مصرف لجن فاضلاب و کلرید کادمیم بر انتقال این عنصر در خاک و جذب آن توسط گیاه، مشاهده کردند که بین غلظت کل کادمیم و غلظت DTPA-Cd در عمق ۲۰ سانتی‌متری خاک ۳۰ و ۱۸۴ روز پس از اعمال تیمارها همبستگی مثبت (به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۸۶) و معنی‌داری وجود دارد (۷).

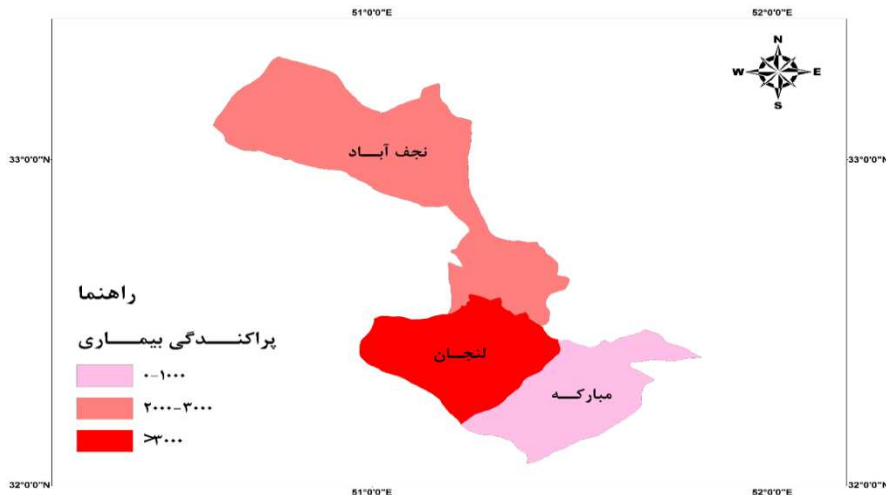
فلزات سنگین پس از ورود به بدن، دیگر از بدن دفع نمی‌شوند بلکه در بافت‌های چربی، عضلات، استخوان‌ها و مفاصل رسوب می‌کنند و انباشته می‌گردند که همین امر موجب بروز بیماری‌ها و عوارض متعددی در بدن می‌شود (۸). روی در بدن انسان با غلظت بالا در پروتئات، استخوان، عضله و کبد تجمع پیدا می‌کند. نیمه عمر روی باقی‌مانده در بدن انسان، یک سال است. روی عنصری حیاتی برای

نجف‌آباد و مبارکه بیشترین میزان را به خود اختصاص داد.

جدول ۱ میانگین غلظت فلز سنگین سرب (Pb) در خاک شهرستان‌های مورد مطالعه و خون بیماران را نشان می‌دهد.

زمانی مورد مطالعه برای آن که تعداد نمونه‌ها قابل استناد باشند، طی سال‌های ۹۱-۱۳۸۷ در نظر گرفته شد (شکل ۱).

همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بیماری نسبت به جمعیت به ترتیب در شهرستان‌های لنجان،



شکل ۱. پراکندگی بیماری در شهرستان‌های مورد مطالعه

جدول ۱. میانگین غلظت فلز سنگین سرب (Pb) در خاک شهرستان‌های مورد مطالعه و خون بیماران

ردیف	Point_X	Point_Y	غلظت سرب در خاک mg/kg	غلظت سرب در خون بیماران (µg/dl)
۱	۵۱/۳۶۵۵	۳۲/۵۹۹۱۴	۷۸/۰	۷۲/۰
۲	۵۱/۵۰۶۸۳	۳۲/۳۴۰۱۷	۷۴/۰	۷۲/۰
۳	۵۱/۳۰۴۷۳	۳۲/۴۷۱۱۶	۷۶/۰	۷۸/۰
۴	۵۱/۳۳۷۷	۳۲/۶۱۶۵۳	۷۰/۰	۶۸/۰
۵	۵۱/۳۷۳۳۹	۳۲/۶۴۲۷۱	۶۰/۰	۶۳/۰
۶	۵۱/۳۳۵۳۲	۳۲/۶۵۶۹۸	۶۹/۰	۶۷/۰
۷	۵۱/۳۱۱۵۲	۳۲/۵۲۱۳۵	۶۶/۵	۶۲/۰
۸	۵۱/۲۸۵۳۵	۳۲/۵۰۲۳۲	۶۳/۸	۶۵/۱
۹	۵۱/۳۱۸۶۶	۳۲/۴۹۲۸	۶۴/۰	۶۳/۰
۱۰	۵۱/۰۹۷۳۷	۳۳/۰۹۹۵۶	۵۳/۰	۵۵/۰
۱۱	۵۱/۰۳۷۸۸	۳۳/۱۲۰۹۸	۵۳/۰	۵۴/۰
۱۲	۵۰/۹۴۹۸۴	۳۳/۱۵۶۶۷	۵۲/۰	۵۱/۲
۱۳	۵۰/۹۸۵۵۳	۳۳/۰۹۴۸	۵۱/۰	۵۲/۸
۱۴	۵۱/۴۷۰۹۵	۳۲/۳۳۱	۵۸/۴	۵۸/۰
۱۵	۵۱/۵۰۶۶۴	۳۲/۲۹۷۶۹	۶۸/۰	۶۵/۱

با تجزیه و تحلیل غلظت فلز سنگین سرب در نرم افزار GIS مشاهده می شود که بیشترین میزان پراکندگی سرب به ترتیب در لنجان، نجف آباد و مبارکه می باشد (شکل ۲).

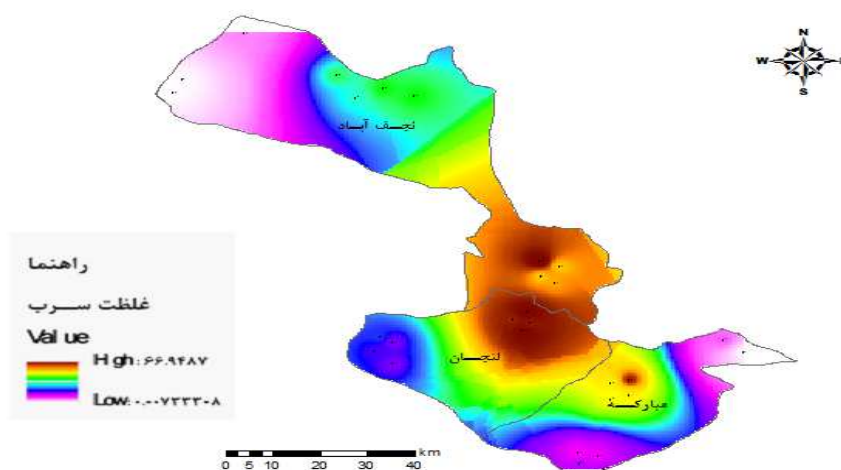
با بررسی مقادیر سرب موجود در خاک و سرب موجود در خون بیماران می توان دریافت که حدود ۹۲ درصد ارتباط بین بیماری و عنصر سرب وجود دارد (شکل ۳).

جدول ۲. میانگین غلظت فلز سنگین روی (Zn) در خاک شهرستان های مورد مطالعه و خون بیماران را

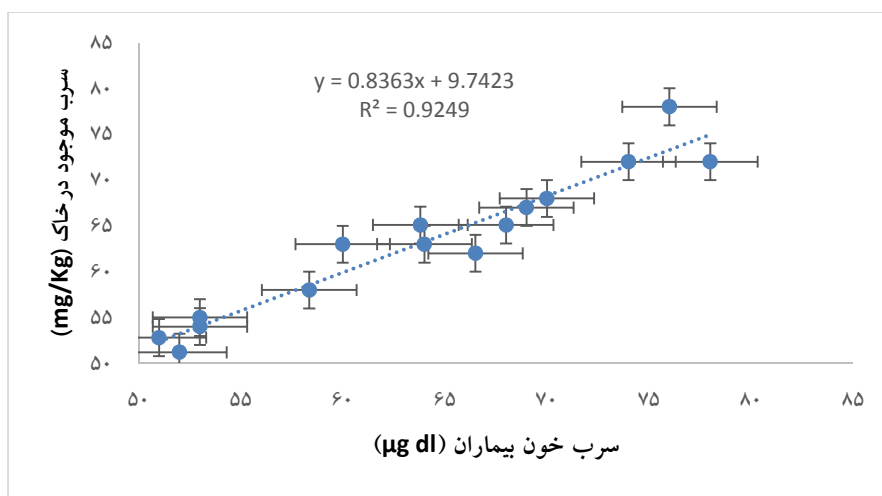
نشان می دهد.

همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می شود، بیشترین میزان روی به ترتیب در شهرستان های مبارکه، نجف آباد و لنجان می باشد که نشان دهنده ی ارتباط منفی با بیماری می باشد؛ یعنی در مبارکه که میزان بیماری کمتر است، میزان روی بیشتر است و نجف آباد و لنجان در جایگاه های بعدی قرار دارند.

شکل ۵ نشان دهنده ی ارتباط منفی روی در خون بیماران با روی خاک است.



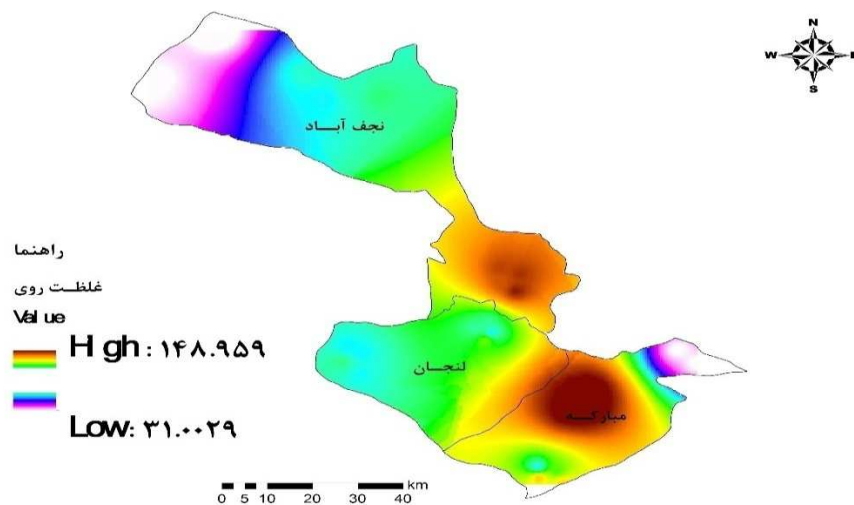
شکل ۲. نقشه ی پراکندگی سرب در خاک شهرستان های مورد مطالعه



شکل ۳. ارتباط سرب موجود در خاک و سرب در خون بیماران

جدول ۲. میانگین غلظت فلز سنگین روی (Zn) در خاک شهرستان‌های مورد مطالعه و خون بیماران

ردیف	Point_X	Point_Y	غلظت روی در خاک mg/kg	غلظت روی در خون بیماران (µg/dl)
۱	۵۱/۳۶۵۵	۳۲/۵۹۹۱۴	۱۳۵	۸۵/۰
۲	۵۱/۵۰۶۸۳	۳۲/۳۴۰۱۷	۱۴۹	۷۹/۳
۳	۵۱/۳۰۴۷۳	۳۲/۴۷۱۱۶	۹۹	۸۳/۰
۴	۵۱/۳۳۷۷	۳۲/۶۱۶۵۳	۱۲۸	۸۰/۰
۵	۵۱/۳۷۳۳۹	۳۲/۶۴۲۷۱	۱۳۲	۷۱/۵
۶	۵۱/۳۳۵۳۲	۳۲/۶۵۶۹۸	۱۳۰	۶۸/۰
۷	۵۱/۳۱۱۵۲	۳۲/۵۲۱۳۵	۸۷	۸۲/۰
۸	۵۱/۲۸۵۳۵	۳۲/۵۰۲۳۲	۸۶	۷۱/۰
۹	۵۱/۳۱۸۶۶	۳۲/۴۹۲۸	۸۰	۷۲/۵
۱۰	۵۱/۰۹۷۳۷	۳۳/۰۹۹۵۶	۸۹	۶۸/۰
۱۱	۵۱/۰۳۷۸۸	۳۳/۱۲۰۹۸	۸۵	۸۰/۰
۱۲	۵۰/۹۴۹۸۴	۳۳/۱۵۶۶۷	۸۴	۸۳/۵
۱۳	۵۰/۹۸۵۵۳	۳۳/۰۹۴۸	۸۱	۷۶/۰
۱۴	۵۱/۴۷۰۹۵	۳۲/۳۳۱	۱۳۷	۷۷/۰
۱۵	۵۱/۵۰۶۶۴	۳۲/۲۹۷۶۹	۱۴۷	۷۷/۲

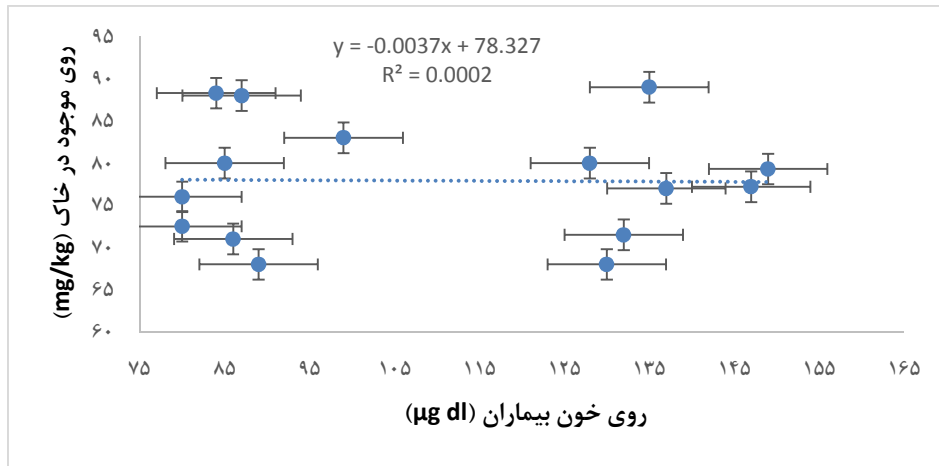


شکل ۴. نقشه‌ی پراکنندگی روی در خاک شهرستان‌های مورد مطالعه

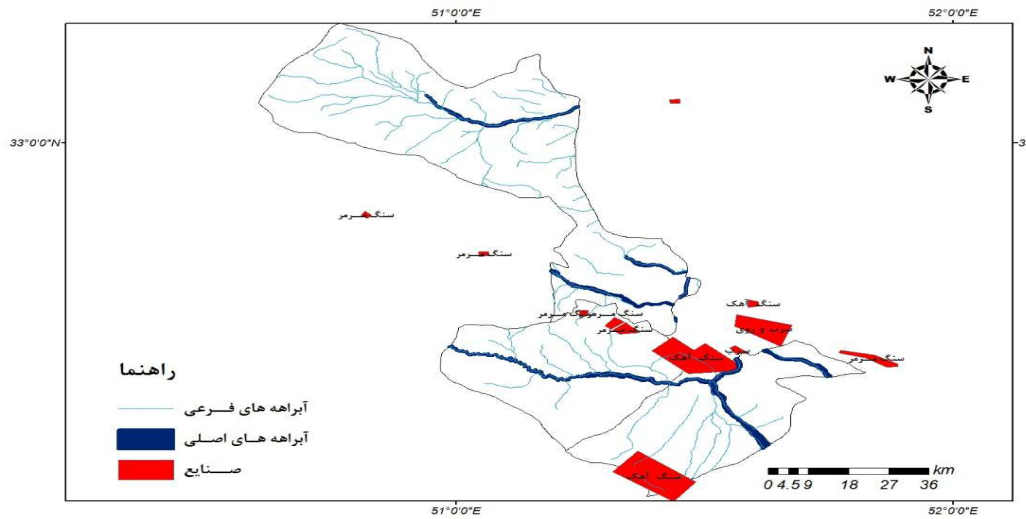
آلودگی‌های ناشی از صنایع یکی از مهم‌ترین سر منشآت سرب است که این مقایسه قضیه را تبیین می‌نماید. از طرفی، اگر با توجه به شکل ۷، محل باغات و محصولات کشاورزی نیز به طور دقیق در همین نقاط است.

با مقایسه‌ی شکل ۶ و شکل ۲ مشاهده می‌شود که محل استقرار صنایع در شهرستان‌های مورد مطالعه، به طور دقیق منطبق و یا نزدیک محل‌های پراکنندگی سرب است که این امر، نشان دهنده‌ی تأثیر پذیری خاک و آب از فرارگیری صنایع در این نقاط است.

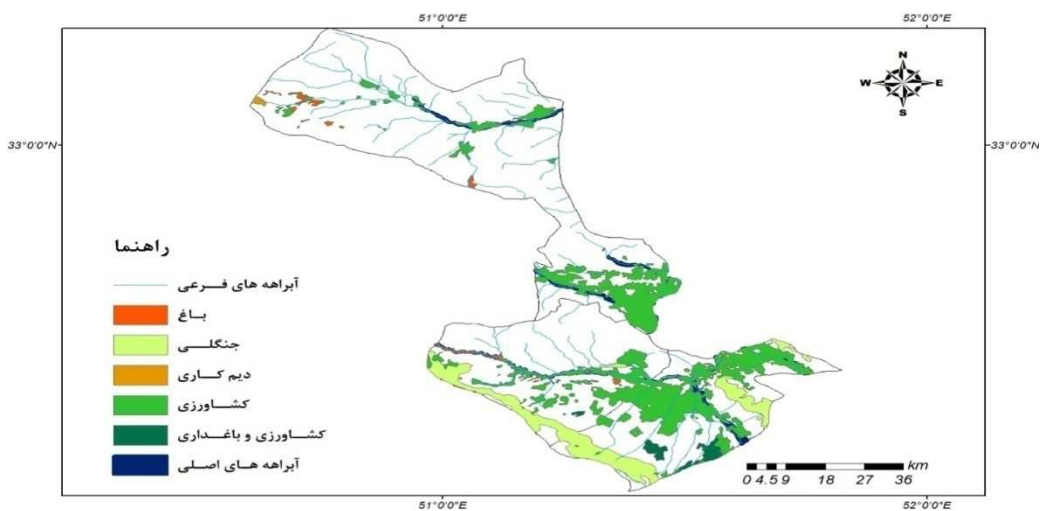




شکل ۵. رابطه‌ی بین روی موجود در خون بیماران با روی موجود در خاک



شکل ۶. پراکندگی صنایع در مناطق مورد مطالعه



شکل ۷. پراکندگی مناطق کشاورزی و باغداری در مناطق مورد مطالعه

## بحث

این مطالعه به منظور بررسی ارتباط بین غلظت فلزات سنگین سرب و روی در اراضی استان اصفهان با بیماری مولتیپل اسکروز انجام شد که با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام شد. بر اساس یافته‌های این پژوهش، میزان سرب در خاک مناطق مورد مطالعه بالاتر از حد مجاز بود (میزان مجاز سرب در خاک ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و این میزان به طور دقیق منطبق بر فراوانی بیماری در این مناطق است. نتایج حاصل از مطالعه‌ی Wong و Lye (۵) از این جهت با مطالعه‌ی حاضر یکسان می‌باشد.

از طرفی، میزان بالای سرب در این مناطق می‌تواند به علت محل استقرار صنایع در این مکان‌ها باشد و مهم‌تر آن که محل باغات، کشاورزی و مسیر عبور آبراهه‌های اصلی و فرعی استان در همین مناطق است که نتایج مطالعات هودجی و جلالیان (۶) و هودجی و افیونی (۷) با مطالعه‌ی حاضر همسو و یکسان است.

با برقراری رگرسیون خطی بین سرانه‌ی بیماری و آلودگی سرب و روی خاک، نتایج حاکی از رابطه‌ی مستقیم سرب با بیماری و رابطه‌ی معکوس روی با بیماری بود. این موضوع می‌تواند تأمل برانگیز باشد؛ یعنی کمبود روی در خاک، به کاهش نسبی روی در گیاهان و گوشتی مصرفی انسان و به طور کلی، چرخه‌ی غذایی منجر می‌شود و این عامل موجب افزایش درصد بیماران می‌شود؛ چرا که عنصر روی که میزان مجاز آن در خاک برابر با ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است، به ترتیب فراوانی در شهرستان‌های مبارکه، نجف‌آباد و لنجان می‌باشد که نشان دهنده‌ی

ارتباط منفی روی با بیماری است یعنی در مبارکه که میزان بیماری کمتر است، میزان روی بیشتر است و نجف‌آباد و لنجان در جایگاه‌های بعدی قرار دارند.

## پیشنهادها

در این مطالعه داده‌های زمینی مورد استفاده قرار گرفت؛ اما در مطالعات مشابه می‌توان با استفاده از تصاویر ماهواره‌ای به نتایج مشابه دست یافت و نتایج را به منظور صحت سنجی با یکدیگر مقایسه نمود.

## نتیجه‌گیری

در مجموع، این مطالعه نشان داد که بیماری مولتیپل اسکروز که در گذشته یک بیماری نادر محسوب می‌شد، در حال حاضر روز به روز گسترش می‌یابد. این بیماری می‌تواند ناشی از افزایش آلاینده‌های محیطی از جمله فلزات سنگین باشد که این امر توجه ویژه‌ی مسؤولین را می‌طلبد.

اصفهان آلوده‌ترین شهر صنعتی ایران است و از نظر غلظت مواد توکسیک و خطرناک در آب، خاک و هوا رتبه‌ی بالایی را در کشور دارد که با تجزیه و تحلیل‌های این پژوهش، نتایج به نفع افزایش آلودگی و به دنبال آن بیماری MS گواهی می‌دهد. وقتی که نقشه‌ی شیوع و پراکندگی بسیاری از بیماری‌ها با علت‌های ناشناخته ترسیم می‌گردد، بسیاری از ناگفته‌ها که شاید نتوان در طی سالیان متمادی بدان رسید، آشکار می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز بهداشت استان اصفهان که در انجام این تحقیق ما را یاری رساندند.

## References

1. Fulgenzi A, Zanella SG, Mariani MM, Vietti D, Ferrero ME. A case of multiple sclerosis improvement following removal of heavy metal intoxication: lessons learnt from Matteo's case. *Biometals* 2012; 25(3): 569-76.
2. Reiber H, Teut M, Pohl D, Rostasy KM, Hanefeld F. Paediatric and adult multiple sclerosis: age-related differences and time course of the neuroimmunological response in cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 2009; 15(12): 1466-80.
3. Das D, Chatterjee A, Mandal BK, Samanta G, Chakraborti D, Chanda B. Arsenic in ground water in six districts of West bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst* 1995; 120(3): 917-24.
4. Exley C, Mamutse G, Korchazhkina O, Pye E, Strekopytov S, Polwart A, et al. Elevated urinary excretion of aluminium and iron in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006; 12(5): 533-40.
5. Wong SL, Lye EJ. Lead, mercury and cadmium levels in Canadians. *Health Rep* 2008; 19(4): 31-6.
6. Hoodaji M, Jalalian A. Distribution of Nickel, Manganese and Cadmium in Soil and Crops in the Mobarakeh Steel Plant Region. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources water and Soil Science* 2004; 8(3): 55-67. [In Persian].
7. Hoodaji M, Afyouni M. Use of sewage sludge cadmium chloride on transport of these elements in soil and absorbed by plants. *Journal of Environmental Sciences and Technology* 2009; 11(2): 47-58. [In Persian].
8. Suess MJ. *Examination of Water for Pollution Control: A Reference Handbook*. Oxford, UK: Pergamon Press; 1982. p. 2, 124, 168.
9. Selinus O, Alloway BJ. *Essentials of Medical Geology: Impacts of the Natural Environment on Public Health*. New York, NY: Academic Press; 2005.

## The Relationship of Concentrations of Lead and Zinc and Multiple Sclerosis in Isfahan Province, Iran

Elham Khosravi MSc<sup>1</sup>, Mehran Houdaji PhD<sup>2</sup>, Masoud Etemadifar MD<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Multiple sclerosis (MS) is one of the most common diseases in neurology and mostly occurs in young adults. The disease is clinically characterized by the involvement of different parts of the central nervous system at different times. Not a cause for the disease has been obtained, and this study aimed to intend benefiting from geographical information system (GIS) to explore a possible link between the disease and environmental factors.

**Methods:** In this research, regions of cities of Najaf Abad, Isfahan, and Mobarake in the west of Isfahan Province were studied. Several soil samples were taken from each area and to measure the lead (Pb) and zinc (Zn) concentrations, atomic absorption spectrophotometer model (Pye Unicam, SPQ) was used. The epidemiology of multiple sclerosis during 2008-2012 was obtained from Isfahan Health Center and the GIS maps of material dispersion and the disease were traced.

**Findings:** A significant portion of multiple sclerosis was consistent with the distribution of lead in the study areas; but the disease had little to do with the distribution of zing.

**Conclusion:** The mapping showed that areas with a high prevalence of multiple sclerosis are consistent with the high contaminants such as lead; this adaptation can explain the association of the disease and environmental factors.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Environmental pollution, Prevalence

**Citation:** Khosravi E, Houdaji M, Etemadifar M. **The Relationship of Concentrations of Lead and Zinc and Multiple Sclerosis in Isfahan Province, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(275): 160-9

1- Department of Soil Science, School of Agriculture, Islamic Azad University, Khorasgan (Isfahan) Branch, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Soil Science, School of Agriculture, Islamic Azad University, Khorasgan (Isfahan) Branch, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Mehran Houdaji PhD, Email: m\_houdaji@khuisf.ac.ir

## مقایسه‌ی تعداد نسخه‌های درج شده‌ی ژن IP-10 با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی بر اساس سیستم ترانسپوزونی PiggyBac در ژنوم سلول‌های Human embryonic kidney

هادی میرزاپور<sup>۱</sup>، آرزو کرمزاده<sup>۱</sup>، دکتر حسین خان احمد<sup>۲</sup>، دکتر رسول صالحی<sup>۳</sup>، دکتر مجید خیرالهی<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** یکی از چالش‌های پیش رو در روش‌های مرسوم تولید پروتئین نوترکیب که ترانسژن به صورت خطی به سلول میزبان وارد می‌شود، هتروژنی در تعداد نسخه‌های ترانسژن در کلون‌های مختلف به دست آمده است که منجر به بیان ژن در سطوح مختلف می‌شود. گذشته از کارایی پایین درج خطی در ژنوم میزبان، پدیده‌ای دیگر به نام Position effect باعث کمتر شدن کارایی بیان ژن می‌گردد. PiggyBac کلاسی از DNA ترانسپوزونی است که می‌تواند به صورت مکانیزم Cut and paste در ژنوم سلول میزبان جابه‌جا شود. برخی خصوصیات منحصر به فرد این ترانسپوزون، آن را به یکی از وکتورهای مناسب در مطالعات انتقال ژن تبدیل کرده است. انتقال ترانسژن با حجم بالا و درج در نواحی فعال از نظر رونویسی، از جمله خصوصیات مهم این ترانسپوزون است که می‌توان از آن در تولید پروتئین نوترکیب با کارایی بالا بهره برد. در این تحقیق، تعداد نسخه‌های درجی در کلون‌های به دست آمده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی این سیستم در رده‌ی سلولی HEK (Human embryonic kidney) مقایسه شده است.

**روش‌ها:** تولید سازه‌های تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی سیستم ترانسپوزاز حاوی ژن IP-10 و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین با استفاده از روش‌های کلونینگ مولکولی به انجام رسید. رده‌ی سلولی HEK پس از تکثیر در پلیت‌های سلولی جهت انجام ترانسفکشن Seed شدند. سازه‌ها با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ترانسفکت شدند و پس از ۴۸ ساعت مورد تیمار با آنتی بیوتیک هیگرومایسین به مدت دو هفته قرار گرفتند. کلون‌های به دست آمده پس از استخراج DNA ژنومی با تکنیک Absolute real-time PCR (Absolute real-time polymerase chain reaction) از نظر تعداد نسخه‌های ژنی درج شده مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** تعداد نسخه‌های ژنی به دست آمده با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی در هر سلول، برابر با ۵ نسخه بود؛ در حالی که این عدد در سیستم دو پلاسمیدی برابر با دو نسخه بود.

**نتیجه‌گیری:** بررسی نتایج حاصل از تعداد نسخه‌های درجی در سیستم‌های تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی نشان داد که سیستم تک پلاسمیدی کارایی بالاتری از لحاظ تعداد نسخه‌های درجی دارد و می‌توان با کلون کردن ژن مورد نظر و کاست بیان‌کننده‌ی آنزیم ترانسپوزاز در یک پلاسمید واحد، تعداد نسخ بیشتری جهت بیان بیشتر پروتئین نوترکیب به دست آورد.

**واژگان کلیدی:** PiggyBac ترانسپوزون، ژن درمانی، پروتئین نوترکیب، تعداد نسخه‌های ترانسژن

**ارجاع:** میرزاپور هادی، کرمزاده آرزو، خان احمد حسین، صالحی رسول، خیرالهی مجید. **مقایسه‌ی تعداد نسخه‌های درج شده‌ی ژن IP-10 با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی بر اساس سیستم ترانسپوزونی PiggyBac در ژنوم سلول‌های**

**Human embryonic kidney.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۵): ۱۷۰-۱۸۱

\* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۱۳۴۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: hossein\_khanahmad@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین خان احمد

## مقدمه

روش مرسوم در تولید پروتئین نوترکیب بر پایه‌ی درج تصادفی ترانسژن در ژنوم میزبان استوار است. در این روش سازه‌ها به صورت پلاسمید حلقوی یا خطی به درون سلول ترانسفکت می‌شوند و در gapهایی که ناشی از شکست رشته‌ی DNA است به درون ژنوم وارد می‌گردند. بدین ترتیب، ترانسژن جزئی از ژنوم میزبان می‌شود و در هر بار تقسیم سلولی، به سلول دختر نیز منتقل می‌گردد. روش مرسوم تولید کلون‌های سلولی پایدار بر پایه‌ی درج تصادفی Heterologous DNA در ژنوم میزبان، زمان‌بر و پرهزینه است و با مقدار تولید غیر قابل پیش‌بینی محصول همراه است (۱).

سلول‌های نوترکیب حاصل از روش ورود استاندارد (Standard transfection) DNA، از نظر تعداد کپی‌های Heterologous DNA و نیز محل درج (Site of insertion) بسیار هتروژن هستند و منجر به طیف وسیعی از سلول‌های نوترکیب مختلف از نظر تولید پروتئین می‌شوند. به همین دلیل، مرحله‌ی انتخاب (Clonal selection) برای حذف سلول‌هایی که محصول را تولید نمی‌کنند و یا در مقدار اندک تولید می‌کنند، ضروری به نظر می‌رسد.

به همین خاطر، شمار زیادی از سلول‌های منتخب برای این که مشخص شود کدام کلون سلولی محصول پروتئین نوترکیب را به میزان مورد توجه تولید می‌کند، باید از این نظر غربالگری شوند که با طولانی شدن زمان غربالگری و تحمیل هزینه‌ی فراوان همراهند (۲). از سوی دیگر، در این روند احتمال یافتن کلونی مناسب با تولید بالای پروتئین کم است (۳). علاوه بر این، رده‌های سلولی منتخب،

هر چند ماه به خاطر Transcription silencing باید تحت بررسی از نظر بیان ژن قرار گیرند (۴).

پدیده‌ی Transcription silencing زمانی مطرح می‌شود که ترانسژن مورد نظر در نواحی غیر فعال از نظر رونویسی درج گردد یا یک عنصر مهار کننده‌ی رونویسی (Silencer) در مجاورت این ترانسژن با تداخل در بیان آن باعث کاهش بیان گردد. از این پدیده به عنوان PEV (Position effect variegation) یا اثر مکانی یاد می‌شود. این پدیده اولین بار در مطالعه‌ای که رنگ چشم جهش یافته‌ی مگس سرکه را بررسی می‌کرد، توسط Weiler و Wakimoto مشاهده شد (۵). این پدیده به وفور در سیستم بر پایه‌ی درج خطی در تولید پروتئین‌های نوترکیب دیده می‌شود و علت اصلی هتروژن بودن کلون‌های نوترکیب مختلف، از نظر میزان بیان ترانسژن است.

عناصر ترانسپوزونی به صورت معمول در دستورزی ژنتیکی ارگانسیم‌های پست‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در عوض، استفاده از آن‌ها در مهره‌داران به دلیل فقدان سیستمی با کارایی بالا در ترانسپوزیشن محدود شده بود تا این که قابلیت ترانسپوزونی PiggyBac در مهره‌داران از جمله انسان و موش به اثبات رسید.

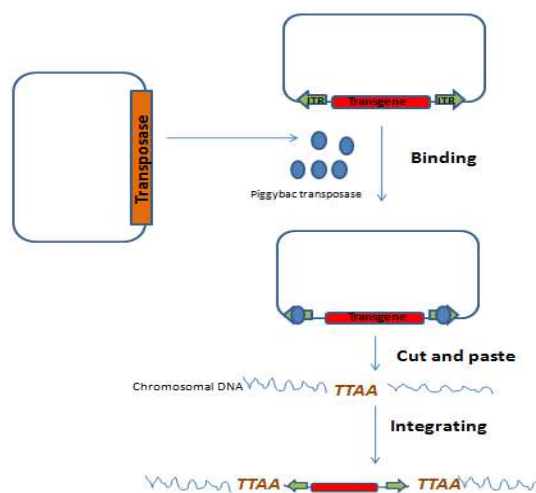
PiggyBac جزء کلاس DNA ترانسپوزون‌ها بود و از ژنوم حشره‌ای به نام Trichoplusiani استخراج گردید (۶). چندین ویژگی منحصر به فرد، سیستم PiggyBac را از سایر سیستم‌های ترانسپوزونی متمایز می‌کند. ویژگی‌هایی از قبیل کارایی بالاتر ترانسپوزونی در مقایسه با سایر سیستم‌های ترانسپوزونی، قدرت درج یک ترانسژن حتی تا اندازه‌ی ۱۴ کیلوباز بدون این که کارایی ترانسپوزونی کاهش پیدا کند و عدم

سکانس ۱۹ جفت بازی به عنوان Internal repeat به همراه یک سکانس بینابینی ۳ جفت بازی بین این دو در انتهای ۵' و همچنین سکانس بینابینی ۳۱ جفت بازی در انتهای ۳' و نیز (Open reading frame) ORF آنزیم ترانسپوزاز (۲/۱ کیلوباز) است (۱۰).

در این مطالعه، تعداد نسخ درج شده‌ی ترانسژن موشی IP-۱۰ با استفاده از سیستم ترانسپوزونی PiggyBac بررسی شد. گروه دو پلاسمیدی شامل پلاسمید بیان کننده‌ی آنزیم ترانسپوزونی PiggyBac و نیز پلاسمید Donor که با کلون کردن ژن موشی IP-۱۰ و ژن مقامت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین در پلاسمید حاوی نواحی تکراری انتهایی PiggyBac به دست آمده می‌باشد. گروه تک پلاسمیدی نیز با کلون سکانس کد کننده‌ی ژن ترانسپوزاز در پلاسمید Donor به دست می‌آید. پس از ترانسفکشن سازه‌ها به سلول و انتخاب کلون‌های نوترکیب، سلول‌ها جهت بررسی تعداد نسخه‌ی ژنی با Absolute Real-time PCR (Absolute real-time polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفتند.

وجود پدیده‌ی Foot printing که در سایر سیستم‌های ترانسپوزونی مشاهده می‌شود، از جمله مزایای این سیستم ترانسپوزونی می‌باشد (۷).

این پدیده به ایجاد جهش در محل استقرار ترانسپوزون هنگام خروج از موضع خود گفته می‌شود. مکانیسم انتقالی در سیستم ترانسپوزونی PiggyBac به صورت Cut and paste است و بر اساس شناسایی سکانس TRE (Terminal repeat element) موجود در دو طرف ترانسژن توسط آنزیم ترانسپوزاز، برش و درج توسط این آنزیم صورت می‌گیرد (شکل ۱).



شکل ۱. شمایی از نحوه‌ی انتقال ژن در سیستم ترانسپوزونی

### PiggyBac

درج قطعه‌ی ترانسژن به صورت هدفمند در ناحیه‌ی اختصاصی با توالی تترانوکلئوتیدی TTAATTA با دوپلیکاسیون این توالی صورت می‌گیرد (۸). درج در ناحیه‌ی اختصاصی نشان از درج هدف‌دار و غیر تصادفی در ژنوم است؛ به طوری که نشان داده شده است که این درج در نواحی فعال از نظر رونویسی می‌باشد (۹). ساختار این سیستم شامل یک سکانس ۱۳ جفت بازی به عنوان Terminal repeat و یک

## روش‌ها

### طراحی و ساخت سازه‌ی دو پلاسمیدی

این سیستم حاوی دو پلاسمید Helper و Donor می‌باشد. پلاسمید Donor حاوی تکرار انتهایی معکوس (TRE) است که در دو انتهای کاست بیان ترانسژن (IP-۱۰+Hyg) قرار گرفته است. پس از سنتز نواحی انتهایی، توالی ۲A پپتید و تعبیه‌ی جایگاه‌های آنزیمی مناسب در میان آن، ترانسژن در میان آن قرار گرفت. کاست بیانی حاوی ترانسژن

۲۰ میکرولیتر از بافر آنزیم ۱۰X، ۷۰ میکرولیتر از پلاسمید و ۱۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از آنزیم‌ها (NheI و MluI) به واکنش اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت.

واکنش لیگاسیون جهت قرارگیری کاست ترانسپوزاز در پلاسمید Backbone بدین صورت انجام گرفت: پس از محاسبه‌ی نسبت مولی ۳ به ۱ به ترتیب برای قطعه‌ی Insert و پلاسمید Backbone، مخلوط واکنش در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از بافر لیگاسیون ۱۰X، ۱۰ میکرولیتر از Insert، ۵ میکرولیتر از Backbone، ۱۱ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر از آنزیم T<sub>4</sub> DNA Ligase بود. مخلوط واکنش یک ساعت در دمای اتاق و به صورت Overnight در دمای ۴ °C در یخچال قرار گرفت.

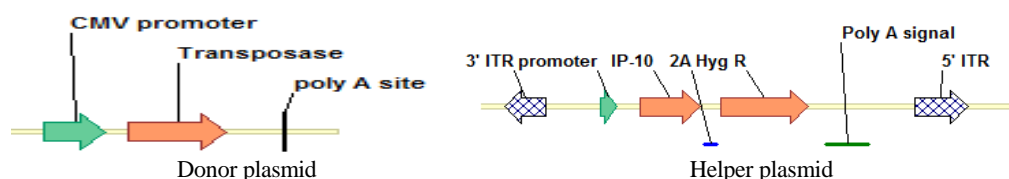
پس از انجام واکنش لیگاسیون، مرحله‌ی ترانسفورماسیون جهت تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب در باکتری‌های مستعد شده (Competent) با استفاده از روش کلسیم کلراید (CaCl<sub>2</sub>) با شوک حرارتی (Heat shock) انجام پذیرفت و کلون‌های نوترکیب در محیط کشت LB agar با استفاده از آنتی بیوتیک آمپی سیلین انتخاب شدند. پس از انتخاب کلونی‌های نوترکیب، با استفاده از روش Quick check صحت درج قطعه‌ی Insert در پلاسمید نوترکیب بررسی شد. شمایی از این سیستم در شکل ۳ موجود است.

IP-۱۰ از پلاسمید pTRE-IP-۱۰ با استفاده از PCR و سایت تعبیه شده‌ی آنزیم BglIII در انتهای پرایمر فوروارد و سایت شناسایی SacII در انتهای پرایمر ریورس از این پلاسمید تکثیر شد.

ژن شاخص انتخاب آنتی بیوتیک یوکاریوتی هیگرومایسین از پلاسمید pCDNA<sup>3</sup>/1/Hyg با سایت‌های آنزیمی AflIII در انتهای پرایمر فوروارد و سایت آنزیمی AgeI در انتهای پرایمر ریورس با PCR تکثیر شد و پس از هضم آنزیمی توالی سنتز شده و طی واکنش‌های لیگاسیون، قطعات در سایت‌های تعبیه شده‌ی آنزیمی، در بین توالی انتهایی معکوس قرار گرفت. نمایی از دو پلاسمید مورد نظر در این سیستم در شکل ۲ نشان داده شده است.

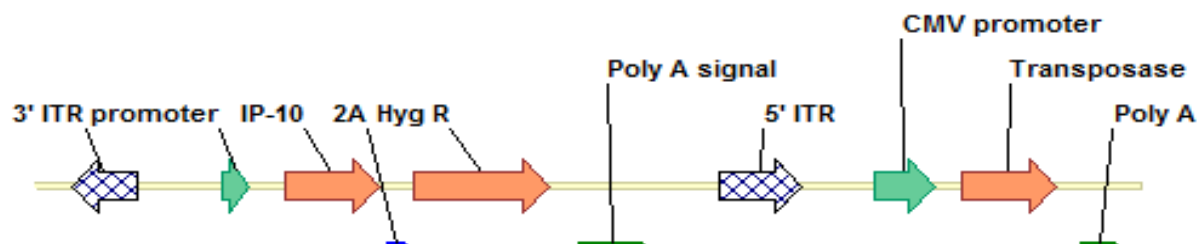
### ساخت سازه‌ی تک پلاسمیدی (Helper-independent plasmid)

این سیستم در یک سازه‌ی واحد، حاوی کاست بیان کننده‌ی آنزیم ترانسپوزاز و ترانسژن IP-۱۰ محصور شده در توالی‌های انتهایی معکوس می‌باشد. کاست بیان کننده‌ی ترانسپوزاز از طریق PCR از روی پلاسمید pCMV-HyPBBase با استفاده از پرایمرهای فوروارد و ریورس دارای سایت آنزیم‌های NheI و MluI تکثیر شد و در سایت آنزیم‌های مورد نظر در پلاسمید حاصل از مرحله‌ی قبل قرار گرفت. واکنش هضم بر روی پلاسمید Backbone جهت قرارگیری محصول PCR (کاست ترانسپوزاز) به این صورت انجام شد: در حجم ۲۰۰ میکرولیتر واکنش هضم،



شکل ۲. نمایی از سازه‌های پلاسمید Donor و Helper





شکل ۳. نمایی از سازه‌ی تک پلاسمیدی

شد. سپس کل مخلوط به هر چاهک اضافه گردید. پلیت تکان داده شد و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در انکوباتور دی اکسید کربن قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت فرصت جهت بیان ژن مقامت به هیگرومایسین، برای انتخاب کلون‌های نوترکیب، سلول‌ها به مدت ۲ هفته در محیط حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین  $150\ \mu\text{g/ml}$  قرار داده شد. سلول‌ها در ۲ گروه مورد ترانسفکشن قرار گرفتند. گروه اول شامل ترانسفکشن سیستم دو پلاسمیدی که عبارت از پلاسمیدهای Helper و Donor بودند و گروه دوم ترانسفکشن گروه تک پلاسمیدی. هر یک از گروه‌ها در ۳ چاهک پلیت ۶ خانه مورد ترانسفکشن قرار گرفتند.

#### استخراج DNA ژنومیک جهت بررسی تعداد نسخه‌های درج شده

استخراج DNA با استفاده از AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit شرکت Bioneer با شماره کاتالوگ K-۳۰۳۲ Cat. No.: صورت گرفت.  $10^5$  سلول پس از جمع‌آوری مطابق با پروتکل شرکت سازنده مورد استخراج DNA ژنومی قرار گرفتند.

#### رسم منحنی استاندارد جهت اندازه‌گیری تعداد نسخه‌های درج شده در ژنوم سلول

جهت بررسی دقیق تعداد نسخه‌های ژنی با استفاده از Absolute real-time PCR، رسم منحنی استاندارد بر

#### کشت سلول‌های HEK (Human embryonic kidney cell)

سلول‌های HEK (Human Embryonic kidney) از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور ایران) خریداری شدند و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) حاوی  $1000$  واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین،  $100$  میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و  $10$  درصد سرم جنین گوساله و در انکوباتور مرطوب با  $5$  درصد دی اکسید کربن و حرارت  $37^{\circ}\text{C}$  کشت داده شدند. پس از رسیدن به تعداد مورد نظر، سلول‌ها برای ترانسفکشن سازه‌ها آماده شدند.

#### ترانسفکشن سلول‌های HEK با Lipofectamin ۲۰۰۰ Transfection Reagent

در یک چاهک ۶ خانه‌ای تعداد  $2/5 \times 10^5$  سلول در  $2$  میلی‌لیتر Growth medium،  $24$  ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند.  $2$  ساعت قبل از ترانسفکشن، محیط کشت قبلی با محیط تازه تعویض شد. بر اساس پروتکل شرکت سازنده،  $4$  میکروگرم از DNA در  $250$  میکرولیتر از Serum free DMEM رقیق شد و به آرامی با  $10$  میکرولیتر محلول Lipofectamin ۲۰۰۰ Transfection Reagent مخلوط و به مدت  $20-15$  دقیقه در دمای اتاق انکوبه

## روش بررسی کارایی ترانسپوزونی بر اساس

## Real-time PCR

جهت بررسی این که تعداد نسخه‌های درج یافته در ژنوم بر اساس فعالیت ترانسپوزونی PiggyBac بوده است یا حاصل درج راندوم پلاسمید، روش تأییدی بر اساس Real-time PCR انجام پذیرفت. بدین صورت که پرایمرها در این روش طوری طراحی شدند که یکی از پرایمرها در داخل توالی انتهایی ترانسپوزون و دیگری در سکانس پلاسمیدی خارج از توالی انتهایی قرار بگیرند (شکل ۴). تکثیر پرایمرها نشان از درج راندوم دارد و با محاسبه‌ی تعداد دقیق کپی آن‌ها و کسر آن از تعداد نسخه‌های هر گروه، میزان فعالیت ترانسپوزونی مشخص می‌شود. توالی پرایمرها به ترتیب زیر است:

Forward:

۵'ACAGACCGATAAAACACATGC۳'

Reverse:

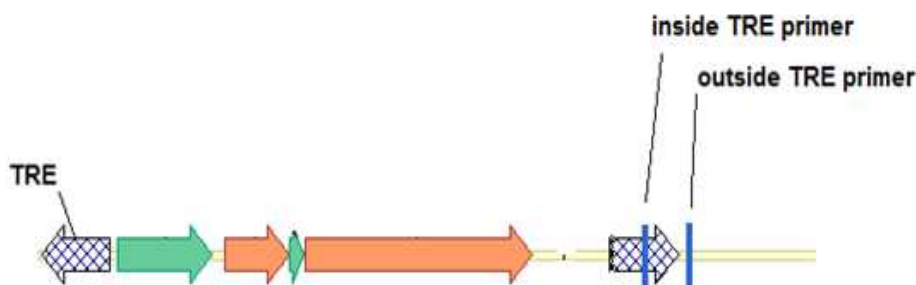
۵'CTCACTATAGGGCGAATTGG۳'

## یافته‌ها

## نتایج حاصل از تولید کلون‌های سلولی نوترکیب

پس از آن که سازه‌ی پلاسمیدی حاوی ترانسژن و آنزیم ترانسپوزاز به سلول‌های HEK ترانسفکت شد، سلول‌ها به مدت ۲ هفته تحت تیمار با آنتی بیوتیک

اساس رقت‌های سریالی از پلاسمید حاوی ترانسژن IP-۱۰ نیاز می‌باشد. در این مرحله، ابتدا غلظت پلاسمید حاوی ترانسژن توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و سپس تعداد کپی مورد نظر در دو میکرولیتر موجود در واکنش PCR محاسبه شد. رقت‌های متوالی (300000-۳۰ کپی ژن در هر واکنش) از این پلاسمید برای رسم منحنی استاندارد (واکنش) بر اساس Ct Value به دست آمده از هر یک رقت‌های سریالی پلاسمید تهیه شد. مراحل کار به این صورت بود که ابتدا Mass پلاسمید با ضرب اندازه‌ی آن در عدد  $1/0.96e-21$  g/bp به دست آمد. سپس Mass of plasmid DNA در هر یک از رقت‌ها (300000-۳۰) به دست آمد و پس از آن غلظت DNA پلاسمیدی برای رسیدن به کپی مورد نظر با تقسیم بر عدد ۲ (مقداری از DNA که در واکنش وارد شد) محاسبه شد. سپس با انجام معادله‌ی  $C_1V_1 = C_2V_2$  سریال دایلوژن از Stock پلاسمیدی تهیه شد. کارایی PCR نیز با استفاده از فرمول  $E = (10^{-1/slope}) - 1$  به دست آمد. پرایمر فوروارد مورد استفاده جهت تکثیر سکانس ژن IP-۱۰، ۳' TCCTCATGGCTGTTTCTGG ۵' و پرایمر ریورس ۳' GTCACCATCCTTTTGCCAG ۵' بود.



شکل ۴. جایگاه قرارگیری پرایمرهای مخصوص بررسی کارایی ترانسپوزونی

هر یک از رقت‌ها توسط دستگاه رسم شد (شکل ۶). همچنین بر اساس Ct value به دست آمده از نمونه‌ی DNA کلون‌های نوترکیب هر یک از گروه‌ها، مقدار مورد نظر توسط دستگاه به صورت خودکار محاسبه گردید (شکل ۷).

این مقدار برای گروه تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی به ترتیب برابر با  $10^3 \times 151/51$  و  $10^3 \times 60$  کپی در ۲ میکرولیتر DNA واکنش PCR بود. از آن جایی که این تعداد کپی در حجم ۲ میکرولیتر با غلظت  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  از DNA ژنومی در واکنش PCR بود و نیز این مقدار نماینده‌ی سلول‌هایی با تعداد نامشخص است. پس از محاسبه‌ی نهایی و لحاظ کردن Diploid genome equivalent که در سلول‌های انسانی برابر  $\text{pg}/\text{diploid genome}$  ۶/۶ است، تعداد نسخه‌ها در هر گروه به دست آمد که در سیستم تک پلاسمیدی برابر با ۵ نسخه و در سیستم دو پلاسمیدی برابر با ۲ نسخه در هر سلول محاسبه شد. بر اساس شیب خط منحنی حاصل از نمودار استاندارد و قرار دادن آن در فرمول، کارایی PCR برابر با ۹۵ درصد محاسبه شد.

هیگرومایسین با غلظت  $150 \mu\text{g}/\text{ml}$  قرار گرفتند. محیط‌های کشت سلولی حاوی آنتی بیوتیک هر ۳ روز یک بار تعویض شدند. سلول‌های غیر نوترکیب فاقد پلاسمید مورد نظر از بین رفتند؛ اما کلون‌های نوترکیب مقاوم به هیگرومایسین باقی ماندند. پس از دو هفته از تیمار آنتی بیوتیک هیگرومایسین، ۲۱ کلون نوترکیب در ۳ چاهک پلیت ۶ خانه در گروه تک پلاسمیدی و ۱۳ کلون در گروه دو پلاسمیدی مشاهده گردید. گروه شاهد منفی حاوی پلاسمید Mock نیز پس از ۲ هفته از بین رفت (شکل ۵).

### نتایج حاصل از استخراج DNA و بررسی تعداد

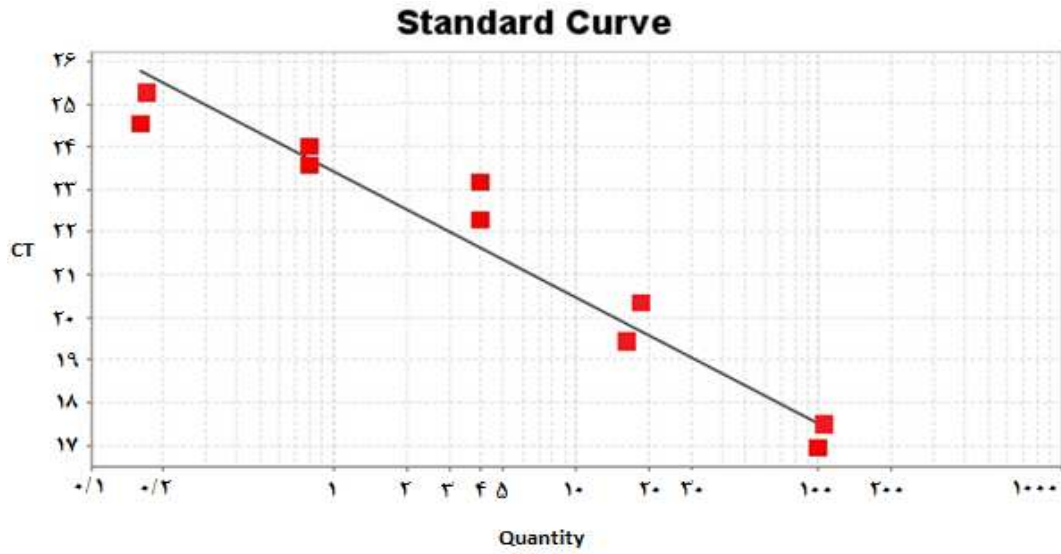
#### نسخه‌های درج شده‌ی ترانسژن IP-۱۰

جهت اطمینان از کیفیت DNA‌های استخراجی هر یک از آن‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد. باند حاصل از استخراج، به صورت یک باند قوی بر روی ژل آگارز مشاهده شد که نشان از کیفیت خوب استخراج DNA دارد.

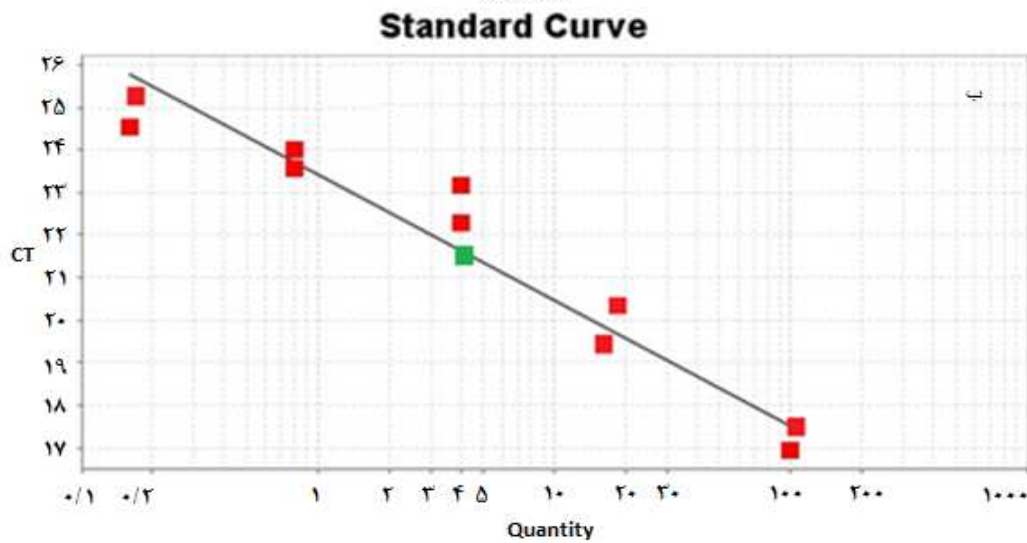
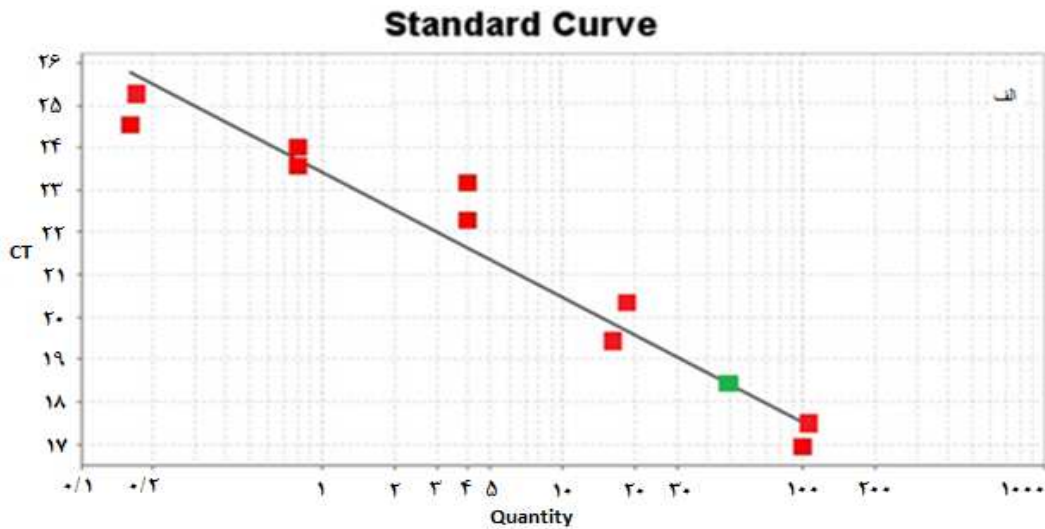
رسم منحنی استاندارد با رقت‌های سریالی پلاسمید (تعداد نسخه‌های ۳۰-۳۰۰۰۰۰) حاوی ترانسژن IP-۱۰ بر اساس Ct value به دست آمده از



شکل ۵. نمایی از یک کلون نوترکیب پس از دو هفته تیمار سلول‌ها با آنتی بیوتیک هیگرومایسین



شکل ۶. منحنی استاندارد حاصل از رقت‌های سریالی حاوی پلاسمید ژن IP-10



شکل ۷. موقعیت تکثیر ژن IP-10 در گروه تک پلاسمیدی (الف) و دو پلاسمیدی (ب)

## نتایج حاصل از بررسی درج به واسطه‌ی فعالیت

### ترانسپوزنی

بر اساس منحنی استاندارد رسم شده جهت اندازه‌گیری تعداد نسخه‌های ژنی و سپس انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌ی DNA با پرایمرهای مخصوص، مقدار درج تصادفی در سلول بررسی شد. بدین صورت که در گروه تک پلاسمیدی میانگین تعداد نسخه‌ی تصادفی، ۱ نسخه در هر سلول به دست آمد.

### بحث

نتایج این مطالعه، توانایی سیستم تک پلاسمیدی PiggyBac در تشکیل کلون‌های نوترکیب سلولی HEK را نشان داده است. بررسی کلون‌های به دست آمده بعد از یک ماه از مرحله‌ی ترانسفکشن از نظر بیان ژن تأیید نمود که ترانسژن مورد نظر در ژنوم سلول درج پایدار شده و بیان آن‌ها به صورت دائمی است؛ زیرا در بیان موقت حداکثر ۴ تا ۷ روز بیان ژن در سلول وجود دارد.

بررسی تعداد نسخه‌های درج شده در ژنوم در کلون‌های نوترکیب با استفاده از Absolute real-time PCR مشخص نمود که در کلون نوترکیب گروه تک پلاسمیدی، تعداد نسخه‌های ژنی برابر با ۵ نسخه در هر سلول بوده است. این عدد مطابق با سایر مطالعاتی بود که از PiggyBac در تولید کلون‌های نوترکیب استفاده کرده بودند (۱۱).

همچنین جهت بررسی این که آیا نسخه‌های درج شده حاصل فعالیت ترانسپوزونی است یا درج تصادفی اتفاق افتاده است، از یک روش PCR based استفاده شد؛ بدین ترتیب که یک جفت پرایمر طوری

طراحی شد که یکی از آن‌ها در داخل ناحیه‌ی انتهایی PiggyBac و دیگری در پلاسمید Backbone قرار دارد. تکثیر این واکنش نشان می‌دهد که چند نسخه درج شده در ژنوم حاصل روی‌داد Random integration است تا فعالیت ترانسپوزونی. در این مورد نتایج نشان داد که در کلون تک پلاسمیدی، درج تصادفی برابر با یک نسخه بود. بدین ترتیب یکی از ۵ نسخه‌ی درجی در کلون‌های تک پلاسمیدی حاصل درج تصادفی بود و در کلون دو پلاسمیدی درج‌ها مربوط به فعالیت ترانسپوزونی بود.

کاربرد سیستم ترانسپوزونی PiggyBac تنها به تولید رده‌های نوترکیب پایدار محدود نمی‌شود و یکی از کاربردهای آن که مطالعات زیادی درباره‌ی آن صورت گرفت، استفاده از این سیستم در ژن درمانی است. قابلیت درج ایمن و کارایی بیان در ژنوم میزبان از جمله مواردی است که در زمینه‌ی ژن درمانی باید مد نظر قرار گیرد. در سال‌های اخیر وکتورهای ویروسی جهت بیان دایم و یا موقت در فازهای Preclinical به وفور در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲).

گذشته از کارایی بالای ترانسپوزونی PiggyBac در سلول‌های پستانداران، روش‌های انتقال وکتورهای غیر ویروسی کماکان یک چالش عمده در استفاده از این وکتورها محسوب می‌شود. این مشکل وقتی بیشتر جلوه می‌کند که کارایی بالای وکتورهای ویروسی در ترانسداکشن سلول‌های پستانداران، یک مزیت عمده‌ی استفاده از آن‌ها است. در سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی جهت بهبود انتقال وکتورهای پلاسمیدی به سلول‌ها با روش‌های غیر ویروسی انجام شده است.

استفاده از وکتورهای هیبرید که ترکیبی از وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی است، می‌تواند کارایی حاصل از ترانسفکشن سلول‌ها را بالا ببرد و بدین ترتیب با افزایش کارایی ترانسفکشن، تعداد کلون‌های نو ترکیب بیشتری به دست آید و در عمل، کلون‌های بیشتری برای بررسی بیان ژنی موجود باشد. تا به حال مطالعه‌ای جهت تولید وکتور هیبرید متشکل از سیستم ترانسپوزونی PiggyBac و سیستم لنتی ویروسی انجام نشده است و به نظر با طراحی این نوع مطالعه، می‌توان به یک سیستم مطلوب چه در زمینه‌ی ژن درمانی و چه صنعت پروتئین نو ترکیب دست یافت.

### تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که بودجه‌ی انجام این تحقیق را تأمین نمود.

یکی از برجسته‌ترین این تلاش‌ها، تولید وکتورهای هیبرید متشکل از سیستم‌های ویروسی و ترانسپوزونی است. این وکتورها از ویژگی هر دو سیستم بهره می‌گیرند؛ به طوری که مزیت بالای ورود به سلول را از وکتور ویروسی و مزیت درج ایمن در ژنوم را از سیستم ترانسپوزونی در اختیار دارد. سیستم ویروسی در این وکتورها قابلیت درج در ژنوم را به واسطه‌ی جهش در آنزیم ایتگرز از دست می‌دهد؛ در نتیجه، درج‌ها به واسطه‌ی سیستم ترانسپوزونی صورت می‌گیرد.

طی یک مطالعه Vink و همکاران، یک وکتور هیبرید متشکل از لنتی ویروس‌ها و سیستم ترانسپوزونی Sleeping beauty تولید کردند. وکتور ویروسی یک Integrase defective lentivirus بود که قابلیت درج در ژنوم را از دست داده بود. نتیجه‌ی کار آن‌ها، درج ترانسژن در ژنوم با پروفایل مربوط به سیستم ترانسپوزونی بوده است (۱۳).

### References

- Gorman C, Bullock C. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11(5): 455-60.
- Matasci M, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM. The PiggyBac transposon enhances the frequency of CHO stable cell line generation and yields recombinant lines with superior productivity and stability. *Biotechnol Bioeng* 2011; 108(9): 2141-50.
- Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol* 2007; 25(9): 425-32.
- Kwaks TH, Otte AP. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends Biotechnol* 2006; 24(3): 137-42.
- Weiler KS, Wakimoto BT. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 577-605.
- Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol Biol* 1996; 5(2): 141-51.
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 2005; 122(3): 473-83.
- Bauser CA, Elick TA, Fraser MJ. Proteins from nuclear extracts of two lepidopteran cell lines recognize the ends of TTAA-specific transposons piggyBac and tagalong. *Insect Mol Biol* 1999; 8(2): 223-30.
- Galvan DL, Nakazawa Y, Kaja A, Kettlun C, Cooper LJ, Rooney CM, et al. Genome-wide mapping of PiggyBac transposon integrations in primary human T cells. *J Immunother* 2009; 32(8): 837-44.
- Fraser MJ, Cary L, Boonvisudhi K, Wang HG. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a

- baculovirus genome as a target DNA. *Virology* 1995; 211(2): 397-407.
- 11.** Matasci M, Bachmann V, Baldi L, Hacker DL, De JM, Wurm FM. CHO cell lines generated by PiggyBac transposition. *BMC Proc* 2011; 5(Suppl 8): 31.
- 12.** Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(4): 1531-6.
- 13.** Vink CA, Gaspar HB, Gabriel R, Schmidt M, McIvor RS, Thrasher AJ, et al. Sleeping beauty transposition from nonintegrating lentivirus. *Mol Ther* 2009; 17(7): 1197-204.

## Comparison of Inserted Mouse IP-10 Gene Copy Number in Helper-Dependent and Independent System Based on PiggyBac Transposition in Human Embryonic Kidney Cells

Hadi Mirzapour<sup>1</sup>, Arezo Karamzade<sup>1</sup>, Hossein Khanahmad PhD<sup>2</sup>,  
Rasoul Salehi PhD<sup>3</sup>, Majid Kheirollahi PhD<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** A major bottleneck in the production of recombinant proteins in conventional linear method is the heterogeneity in number of transgene copies in the genome of the host cell that lead to variable levels of transgene expression. Aside from the low efficiency of the random integration, other phenomena such as positional effect contribute to low efficiency of transgene expression. PiggyBac is a class of DNA transposons which can transpose through “cut and paste” mechanism in host genome. Some specific characteristic of this transposon makes it promise vector in gene transfer studies. High capacity of transgene transposition and flexibility in molecular engineering of transposase are characteristics of PiggyBac transposons that are important in recombinant protein and gene therapy approaches. The aim of this study was estimation of transgene copy number based on helper-dependent and independent PiggyBac transposition system in human embryonic kidney (HEK) cells.

**Methods:** Plasmid containing interferon gamma inducible protein 10 (IP-10) coding sequence flanked by PiggyBac terminal repeat element and plasmid containing transposase system and a unit plasmid containing both transposase and IP-10 coding sequence were used for generating recombinant cells in helper-dependent and independent system, respectively. Human embryonic kidney cells were transfected by each group. After clonal selection, absolute quantitative real-time polymerase chain reaction was used for estimation of transgene copy number.

**Findings:** Estimation of IP-10 copy number has revealed 5 and 2 copies per cell in helper-independent and dependent system, respectively.

**Conclusion:** Here, we report activity of PiggyBac transposition in human embryonic kidney cell line. PiggyBac helper-independent and dependent system was used for generation of stable cell line producing mouse IP-10 protein and our data confirmed permanent expression of this transgene with the mean of about 5 transgene copies per each cell.

**Keywords:** Piggybac transposon, Gene therapy, Recombinant protein, Transgene copy number

**Citation:** Mirzapour H, Karamzade A, Khanahmad H, Salehi R, Kheirollahi M. **Comparison of Inserted Mouse IP-10 Gene Copy Number in Helper-Dependent and Independent System Based on PiggyBac Transposition in Human Embryonic Kidney Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(275): 170-81

\* This paper is derived from a MSc thesis No. 391344 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Hossein Khanahmad PhD, Email: hossein\_khanahmad@yahoo.com



## بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های کریتیدیا در شهر اصفهان و حومه

دکتر منیر دودی<sup>۱</sup>، دکتر محبوبه سترکی<sup>۲</sup>، دکتر گیلدا اسلامی<sup>۳</sup>، دکتر سید حسین حجازی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** ژنوتایپینگ گونه‌های کریتیدیا، جهت انتخاب روش مناسب برای کنترل و پیشگیری از بیماری لیشمانیوز جلدی، تعیین بهتر اثر درمانی داروها و تهیه و ارزیابی واکسن با اهمیت است.

**روش‌ها:** در این مطالعه، به منظور تشخیص سویه‌های کریتیدیا از ۶۰۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی نوع مرطوب مراجعه کننده به مرکز تحقیقات پوست و سالک حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) در اصفهان و سایر مراکز درمانی حومه‌ی اصفهان، نمونه‌گیری به عمل آمد. در مورد ۲۰۱ بیمار (۳۹/۳۳ درصد) ابتدا کشت در محیط NNN (Novy-Nicol-Mac Nea) و سپس استخراج DNA از پروماستیگوت‌ها به عمل آمد و سپس روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction -restriction fragment length polymorphism) اجرا شد و ناحیه‌ی ITS<sub>۱</sub> (Internal transcribed spacer) تکثیر و آنزیم HaeIII به کار گرفته شد.

**یافته‌ها:** دو گونه‌ی کریتیدیا به نام‌های کریتیدیا فاسیکولاتا ۲۷ مورد (۴۴/۱۳ درصد) و کریتیدیا لوسیلیا ۱۱ مورد (۴۷/۵ درصد) و بقیه تریپانوزماتیده با کد GQ۳۳۱۹۸۸ بودند که پس از آنالیز مولکولی، ۹۲ درصد شباهت با کریتیدیا فاسیکولاتا و ۸۹ درصد شباهت با کریتیدیا لوسیلیا نشان دادند و ۱۶۳ مورد (۰۹/۸۱ درصد) گزارش شدند. از ۳۵۱ بیمار (۳۱/۵۸ درصد) لیشمانیا جداسازی گردید و از ۵۰ بیمار (۳۱/۸ درصد) نه لیشمانیا و نه کریتیدیا جداسازی نشد. سپس نمونه‌ی کشت آن‌ها منفی گزارش گردید.

**نتیجه‌گیری:** در نهایت، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نه تنها کریتیدیا به عنوان آلوده کننده‌ی کشت‌های لیشمانیا در اصفهان و مناطق اطراف آن است؛ بلکه دارای پلی مورفیسم ژنتیکی نیز می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** پلی مورفیسم، کریتیدیا، Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism، Internal transcribed spacer<sub>۱</sub>.

**ارجاع:** دودی منیر، سترکی محبوبه، اسلامی گیلدا، حجازی سید حسین. بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های کریتیدیا در شهر

اصفهان و حومه. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۵): ۱۹۳-۱۸۲

#### مقدمه

تاژک‌داران خون و نسج گروه وسیعی از انگل‌های تک یاخته‌ای را شامل می‌شوند که حداقل در یکی از مراحل سیر تکاملی دارای تاژک می‌باشند. تاژک‌داران

خون و نسج دارای یک تا چهار شکل در چرخه‌ی زندگی یک تک یاخته می‌باشند که عبارت از پروماستیگوت یا لپتوموناد، اپی ماستیگوت یا شکل کریتیدیایی، تریپاماستیگوت یا شکل تریپانوزومی و

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایذه، ایذه، ایران

۳- استادیار، گروه انگل‌شناسی و فارم‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۴- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و فارم‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

آماستگوت یا لیشمان بادی می‌باشند (۱).

کریتیدیاها به صورت انگل حشرات مطرح می‌باشند؛ اما از آن جایی که در سکانس ژنی rRNA (Ribosomal RNA) بسیار نزدیک به لیشمانیاها می‌باشند، بسیاری از اوقات همراه با لیشمانیاها مطرح می‌شوند (۲). کریتیدیا اونکوپلتی (از یک حشره‌ی تغذیه کننده از یک شیره‌ی گیاه اونکوپلتوس فاشیاتوس و کریتیدیا دآنی از یک حشره‌ی شکارگر به نام زئولوسئوگروگراموس و کریتیدیا دسوزایی از یک مگس تغذیه کننده از شهد گل‌ها به نام اورینیدیا ابسا جداسازی شده‌اند (۳-۵). کریتیدیا لوسیلیا و کریتیدیا فاسیکولاتا از جمله کریتیدیا‌هایی می‌باشند که نه تنها انگل حشرات هستند؛ بلکه به عنوان عوامل آلوده کننده‌ی محیط‌های کشت لیشمانیا تلقی می‌شوند (۲).

در طی بیست سال گذشته، روش‌های متنوعی در جهت تعیین زیر گونه‌های مختلف لیشمانیا و کریتیدیا و مطالعه‌ی تنوع مولکولی و تأثیرات متقابل انگل و میزبان توسعه یافته است (۶-۸). شایان ذکر است که برای تمایز گونه‌های بسیار نزدیک به هم بایستی از روش‌هایی استفاده گردد که دارای خصوصیات زیر باشند:

عملی باشند، به سرعت انجام شوند، مقرون به صرفه باشند و نیاز به مهارت‌های ویژه نداشته باشند. در سال‌های اخیر، روش‌های ژنتیکی و ملکولی متنوعی جهت تفکیک سوبه‌های پاتوژن بیماری‌ها جایگاه ارزشمندی در مطالعات همه‌گیرشناسی و کلینیکی و سایر بیماری‌های عفونی یافته است. توسعه‌ی تکنیک‌های ملکولی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و روش‌های مختلف PCR (Polymerase chain reaction) جهت تشخیص و

تمایز فیلوژنتیک انگل‌ها گزارش شده است (۹). در دهه‌ی اخیر، بسیاری از نشانگرهای مولکولی مورد هدف واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بوده‌اند؛ اما از بین این روش‌ها، آنالیز RFLP (Restriction fragment length polymorphism) مربوط به PCR سکانس‌های تکثیر شده‌ی ژن ITS (Internal transcribed spacer) نتایج امیدوار کننده‌ای را نشان داده است (۹-۱۱).

ژن ITS نسبت به ژن‌های rRNA در بین گونه‌ها کمتر محافظت شده است؛ به همین دلیل، برای بررسی فیلوژنی پلی مورفیسم و ارتباط ارگانسیم‌ها مناسب می‌باشد. در سال‌های اخیر با آنالیز سکانس ITS ارتباط فیلوژنی بسیاری از انگل‌ها را نشان داده‌اند (۱۲-۱۳). محققین معتقدند که ITS به اندازه‌ای است که می‌تواند تشخیص داخل گونه‌ای را نیز مشخص کند. (External transcribed spacer) ETS و ITS همراه با مناطقی که ۲۸S RNA و ۱۸S را کد می‌کنند، به مولکول پیشرو و rRNA تبدیل می‌شوند؛ اما به هر جهت ETS و ITS نسخه‌برداری شده، به طور سریع تجزیه می‌شوند و به نظر می‌رسد که هیچ گونه عملکردی ندارند (۱۴-۱۵).

همان‌طور که در قسمت بالا توضیح داده شد، آخرین قسمت ژن ریوزومی قطعه‌ای از DNA است که از پروموتور تا انتهای ۳ منطقه‌ای که ۲۸S RNA را کد می‌کند، قرار دارد. این منطقه متشکل از SSU RNA (Small subunit RNA)، ۵/۸S RNA و LSU RNA (Large subunit RNA) می‌باشد. این نواحی با مناطق ITS۱ و ITS۲ از هم فاصله می‌گیرند، نواحی غیر قابل نسخه‌برداری را NTS (None Transcribed Spacer) می‌گویند، هر دو

### جمع‌آوری نمونه و آماده‌سازی

زخم‌ها ابتدا با استفاده از اتانول ۷۰ درصد و سرم فیزیولوژی، استریل شدند و سپس از یک بی‌حسی موضعی، محلول گزیلوکائین استفاده شد و با استفاده از یک چاقوی جراحی استریل، برش‌های سطحی به طول ۲-۳ میلی‌متر روی لبه‌های زخم ایجاد شد. سپس این برش‌های تهیه شده به محیط کشت مایع (Brain heart infusion broth, Merk, Germany) BHI استریل در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و یا سرم فیزیولوژی به عنوان محیط انتقالی وارد شد و سپس به محیط کشت (Novy Mac Neal Nicole, Merk, Germany) NNN در کنار شعله انتقال داده شد و در انکوباتوری با دمای  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت.

### جداسازی و کشت نمونه‌ها

همان‌طور که در انتهای قسمت قبل اشاره شد، محیط‌های مایع BHI حاوی نمونه نیز در شرایط استریل به محیط کشت دو فاز NNN جامد در کنار شعله منتقل و در دمای  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد و هر سه روز یک بار به مدت شش هفته قبل از این که منفی گزارش شود، مورد بررسی قرار گرفت. سپس پروماستیگوت‌های تکثیر شده به محیط کشت غنی کننده RPMI ۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute, Merk, Germany) همراه با ۱۰ درصد FCS (Fetal calf serum, Sigma, America) منتقل و تکثیر گردید. سپس نمونه‌های جداسازی شده در اواخر مرحله‌ی لگاریتمی رشد ( $5 \times 10^6$  parasites/ml) برداشت شد و با محلول نمکی بافر فسفات PBS (Phosphate buffered saline, Sigma, America) استریل با pH معادل ۷/۴ سانتریفیوژ و شسته شدند و سپس در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$ ، جهت آزمایش‌های بعدی

نواحی ITS و NTS تغییر پذیری زیادی را نشان می‌دهند، اما ITS به دلیل اندازه‌ی به نسبت کوچکش جالب است که در کنار قطعات به طور کامل حفاظت شده‌ای قرار دارد که پرایمرهای PCR را می‌توان برای آن‌ها طراحی کرد (۱۶-۱۷).

در این پژوهش سعی خواهد شد که اشکال ژنوتایی متفاوت کریتیدیا به کمک روش‌های PCR و RFLP به کمک توالی ژنی ITS۱ مورد بحث و بررسی قرار گیرد و سپس اپیدمیولوژی مولکولی این انگل در منطقه‌ی اصفهان و حومه‌ی آن بررسی گردد.

### روش‌ها

#### بیماران و نواحی تحقیق

این تحقیق در شهر اصفهان و حومه‌ی آن شامل (سمت شمال: زینبیه، برخوار، میمه، شاهین شهر، ملک‌شهر، دولت‌آباد، حبیب‌آباد، خورزوق، دستجرد، زیارتگاه آقا علی عباس، امامزاده نومی، گرگاب، نطنز و بادرود؛ سمت جنوب: سپاهان‌شهر، بهارستان، مبارکه، شهرضا، زرین شهر، دهاقان، سمیرم و مرغ و مهیار؛ سمت شرق: هفتشویه، جرقویه، زیار، خوراسگان، برآن شمالی، قهجاورستان، محمدآباد، اشکوند، گورت، جلگه، اذیه، ورزنه، انرژری اتمی و فرودگاه شهید بهشتی؛ سمت غرب: لنجان، خمینی شهر، نجف‌آباد، کوشک، فلاورجان، پیربکران، اتوبان ذوب آهن، گلدشت، درچه، جوزدان، اصغرآباد و کهریزسنگ) واقع در مرکز ایران انجام شد و ۲۰۱ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌گیری از اول فروردین ماه ۱۳۹۰ تا پایان آبان ماه ۱۳۹۱ (به مدت ۸ ماه) انجام گرفت. زخم‌های لیشمانيوز پوستی افراد انتخاب شده دارای اشکال متفاوتی بودند.

که شامل Taq polymerase به میزان ۲/۰ میکرولیتر،  $MgCl_2$  (۵۰ mM) به میزان ۲ میکرولیتر، پرایمرهای (Reverse) R و (Forward) F با غلظت ۱۰ پیکومول از هر کدام ۱ میکرولیتر، بافر  $10 \times$  PCR به میزان ۲ میکرولیتر، (Deoxynucleotide triphosphates) DNTPs (۱۰ mM) به میزان ۱ میکرولیتر و در نهایت به موارد پیش گفته نمونه‌ی DNA استخراج شده به میزان ۱ میکرولیتر اضافه و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مطابق جدول ۲ نمونه‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر (Corbet, Australia) قرار گرفت و سیکل‌های زیر جهت انجام PCR برنامه‌ریزی شد (جدول ۳). سپس محصولات PCR به همراه کنترل مثبت و منفی در کنار نشانگر مولکولی ۵۰ bp و بر روی ژل آگارز ۵/۱ درصد حاوی  $7/0 \mu g/ml$  اتیدیوم بروماید به ازای هر میلی‌لیتر ژل در بافر  $1 \times$  TBE قرار داده شد و سپس تحت ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۴۵-۲۵ دقیقه الکتروفورز گردید و در نهایت، محصولات PCR در دستگاه ترانس لومیناتور با استفاده از لامپ UV (Ultraviolet) مشاهده شد.

#### تحلیل RFLP جهت ITS۱ تقویت شده

برای تعیین گونه‌ی محصولات ITS۱-PCR تحت تأثیر آنزیم محدود کننده HaeIII (Fermentase, Germany) و بافر مربوط در دمای  $37^\circ C$  به مدت ۲ ساعت هضم شدند و بر روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر  $1 \times$  TBE تحت تأثیر ولتاژ ۸۰ ولت به

قرار داده شد. گونه‌های مرجع مورد استفاده در این تحقیق کریتیدیا فاسیکولاتا و کریتیدیا لوسیلیای استاندارد بودند که از دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه تهران خریداری شدند.

#### استخراج DNA

سوسپانسیون پروماستیگوت‌های دو ایزوله‌ی لیشمانیا و کریتیدیا‌ی شستشو شده در مرحله‌ی قبل حاوی ( $5 \times 10^6$  parasites/ml) از فریزر  $-70^\circ C$  خارج و به رسوب آن ۲۰۰ میکرولیتر Binding buffer و ۴۰ میکرولیتر پروتیناز K اضافه شد و محتویات به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری  $70^\circ C$  قرار داده شد. سایر مراحل مطابق دستورات کیت (Roche, USA), Hih pure PCR template .11796828001 (preparation kit, Cat.NO) انجام شد و در نهایت، DNA در ۲۰۰ میکرولیتر Elution buffer حل شد. DNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی به ترتیب ابتدا به وسیله‌ی اسپکتروفتومتر و سپس با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر  $1 \times$  TBE (Tris borate EDTA, Sigma, America) مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### تکثیر ناحیه‌ی ITS۱ به روش PCR

جهت تکثیر ناحیه‌ی ITS۱ به روش PCR، از پرایمرهای ارایه شده در جدول ۱ استفاده شد. با استفاده از سویه‌های استاندارد بهترین شرایط جهت انجام PCR تعیین شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. ابتدا Master mix تهیه شد

جدول ۱. توالی پرایمرهای L5/AS و LITSr (۱۳، ۲)

پرایمر	عنوان	توالی (۳' → ۵')	طول (باز)
Forward (F)	LITSr	CTGGATCATTTTCCGATG	۱۸
Reverse (R)	L5/AS	TGATACCACTTATCGCACTT	۲۰

جدول ۲. دستورالعمل بهینه شده برای انجام واکنش Polymerase chain reaction

مواد	غلظت اولیه	غلظت نهایی	حجم
۱ بافر PCR	۱۰X	۱X	۲ μL
۲ MgCl <sub>2</sub>	۵۰ mM	۱/۵ mM	۲ μL
۳ DNTP mixed	۱۰ mM	۰/۲ mM	۱ μL
۴ پرایمرها (F + R)	۱۰۰ Pmol/μL	۱۰ Pmol/μL	۲ μL
۵ DNA template	—	۱۰۰ ng	۱ (۱-۵) μL
۶ پلیمرز Taq	۵ U/ml	۱/۲ U/ml	۰/۲ μL
۷ آب مقطر استریل	—	—	بالای ۱۶/۸ μL
حجم کل	—	—	۲۵ μL

PCR: Polymerase chain reaction; DNTP: Deoxynucleotide triphosphate

جدول ۳. سیکل حرارتی استفاده شده جهت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در روش Polymerase chain reaction

مراحل	دما	زمان	سیکل
Initial denaturation	۹۵ °C	۵ دقیقه	۱ سیکل
Denaturation	۹۵ °C	۲۰ ثانیه	۳۰ سیکل
Annealing	۵۳ °C	۳۰ ثانیه	
Extention	۷۲ °C	۱ دقیقه	۳۰ سیکل
Post extention	۷۲ °C	۳ دقیقه	

جدول ۴. لیست آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش

Restriction Endonuclease	Prototype	Recognition Sequence/Cleavage Site	Product No.
HaeIII (BsuRI)	BsnI	GG ↓CC	RV۱۱۸۲
SrfI	BmrFI	CC ↓NGG	RV۱۱۵۴
TaqI	TaqI	T ↓CGA	RE۱۳۴۶
DdeI	BstDEI	C ↓TNAG	RE۱۲۱۲

تحت تأثیر چهار آنزیم HaeIII و SrfI، TaqI، DdeI برش‌های متفاوت با گونه‌ی استاندارد را نشان داده بودند، استفاده شد. این نمونه‌ها به شرکت فزایژوه تهران ارسال شد و خوانش آن توسط کشور کره صورت گرفت. سپس نتایج به کمک نرم افزار Blast مورد تجزیه و تحلیل مولکولی قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری توزیع فراوانی سویه‌های کربتیدیا در منطقه‌ی اصفهان و حومه از آزمون  $\chi^2$  استفاده شد.  $P < ۰/۰۰۱$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سپس جهت تعیین سویه‌های کربتیدیا محصولات ITS۱-PCR تحت تأثیر آنزیم‌های SrfI، TaqI و DdeI (جدول ۴) قرار گرفتند که این آنزیم‌ها به کمک برنامه‌ی Restrictionmap موجود در EBI (European bioinformatics institute) بر اساس ژنوم انتخاب شدند و از شرکت سیناکلون خریداری گردیدند (۱۸).

### تعیین توالی DNA

برای تعیین توالی DNA از محصولات PCR که

## یافته‌ها

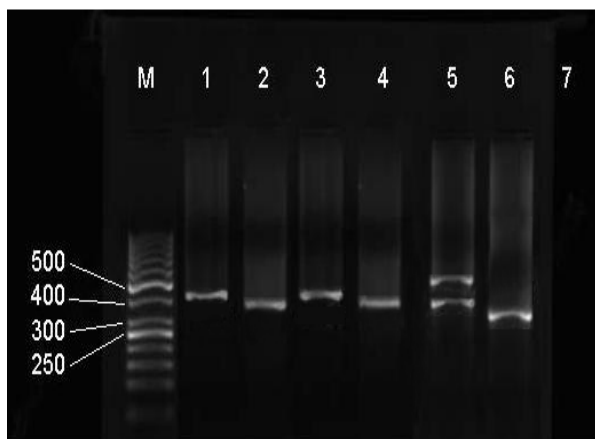
در این تحقیق که در طی ۸ ماه انجام شد، از ۶۰۲ بیمار دارای لیشمانیوز پوستی نوع مرطوب مراجعه کننده به مرکز تحقیقات پوست و سالک اصفهان و سایر مراکز درمانی حومه‌ی اصفهان، نمونه‌گیری به عمل آمد. از ۲۰۱ بیمار (۳۳/۳۹ درصد) پس از کشت در محیط NNN و استخراج DNA از پروماستیگوت‌ها و اجرای روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction -restriction fragment length polymorphism) و تکثیر ناحیه‌ی ITS۱ و به کار بردن آنزیم HaeIII، دو گونه‌ی کریتیدیا به نام‌های کریتیدیا فاسیکولاتا ۲۷ مورد (۱۳/۴۴ درصد) و کریتیدیا لوسیلیا ۱۱ مورد (۵/۴۷ درصد) و بقیه تریپانوزماتیده با کد GQ۳۳۱۹۸۸ بودند که پس از آنالیز مولکولی، ۹۲ درصد شباهت با کریتیدیا فاسیکولاتا و ۸۹ درصد شباهت با کریتیدیا لوسیلیا نشان دادند و ۱۶۳ مورد (۸۱/۰۹ درصد) گزارش شدند.

از ۳۵۱ بیمار (۵۸/۳۱ درصد) انگل لیشمانیا جداسازی گردید و از ۵۰ بیمار (۸/۳۱ درصد) نه انگل لیشمانیا و نه کریتیدیا جداسازی نشد. سپس نمونه‌ی کشت آن‌ها منفی گزارش شد. در نهایت، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۲۰۱ بیمار در این مناطق مورد بررسی قرار گرفتند که ۱۰۳ نمونه (۵۱/۲۴ درصد) مربوط به منطقه‌ی اصفهان و ۹۸ نمونه (۴۸/۷۶ درصد) مربوط به مناطق اطراف اصفهان بودند (جدول ۳).

از مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، می‌توان چنین استنباط نمود که تریپانوزماتیده با کد GQ۳۳۱۹۸۸ نسبت به دو گونه‌ی دیگر کریتیدیا بیشترین فراوانی (۱۶۳ مورد یا ۸۱/۰۹ درصد) را به عنوان آلوده

کننده‌ی محیط کشت داشت.

نتایج PCR-RFLP ایزوله‌ها در اصفهان و حومه با آنزیم برش دهنده‌ی HaeIII نشان داد که تعدادی از ایزوله‌ها تک باند ۳۵۰ bp را نشان دادند و مربوط به جنس لیشمانیا بودند. تعدادی هیچ بانندی (نه لیشمانیا و نه کریتیدیا) را ظاهر نکردند و تعدادی تک باند ۴۰۰ bp را آشکار کردند. در تعدادی دیگر از ایزوله‌ها، تک باند ۴۵۰ bp و در تعداد زیادی از ایزوله‌ها، دو باند ۴۵۰ bp و ۴۰۰ bp مشاهده شد که سه گروه اخیر مربوط به خانواده‌ی تریپانوزوماتیده بودند (شکل ۱). این در حالی است که در برش آنزیمی سه گروه اخیر که مربوط به خانواده‌ی تریپانوزوماتیده بودند، پس از برش با سایر آنزیم‌ها (ScrFI، DdeI و TaqI) هیچ گونه تفاوتی نسبت به نمونه‌های استاندارد مشاهده نشد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).



شکل ۱. پروفایل‌های بانندی ایجاد شده از ژنوم ایزوله‌ها به روش

### PCR-RFLP با آنزیم HaeIII

M: نشانگر مولکولی ۵۰ bp خط ۱: استاندارد

C. fasciculata، خط ۲: استاندارد C. luciliae، خط ۳:

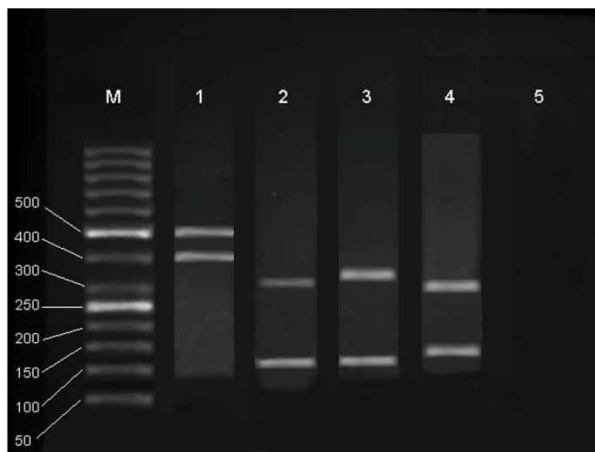
ایزوله‌ی منطبق با C. fasciculata، خط ۴: ایزوله‌ی منطبق با

C. luciliae، خط ۵: ایزوله‌ی غیر منطبق با دو نمونه‌ی استاندارد

C. fasciculata و C. luciliae، خط ۶: جنس لیشمانیا،

خط ۷: شاهد منفی.

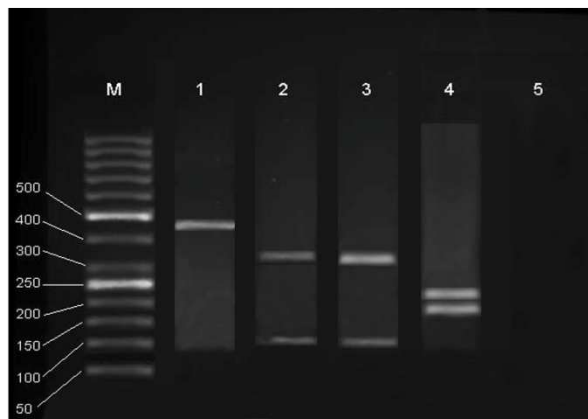
سکانس به شرکت فزاپژوه در تهران ارسال شدند. سپس توسط کشور کره تعیین توالی گردیدند. نتایج مربوط در شکل های ۵، ۶ و ۷ ارایه شده است.



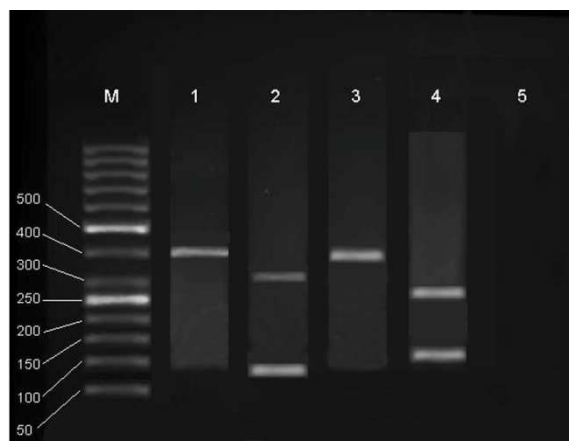
شکل ۴. پروفایل های بانندی ایجاد شده از ژنوم غیر منطبق با استانداردهای *C. fasciulate* و *C. luciliae* (۴۵۰ bp) و M: نشانگر مولکولی ۵۰ bp. خط ۱: نمونهی غیر منطبق با استانداردهای *C. fasciulate* و *C. luciliae*. خط ۲: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *DdeI*. خط ۳: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *Scrfl*. خط ۴: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *TaqI*. خط ۵: شاهد منفی.

### بحث

مطابق با استراتژی های کنترل بیماری لیشمانیوز جلدی در مناطق هایپر آندمیک ایران و تهیهی واکسن جهت کنترل بیماری که از طرف سازمان جهانی بهداشت نیز ارایه شده است (۱۶)، یکی از ضرورت های اساسی، تعیین ویژگی های گونه های جنس کریتیدیا می باشد که متأسفانه باعث آلوده کردن کشت های انگلی لیشمانیا می شود و مانع از تهیهی آنتی ژن خالص از این انگل (جنس لیشمانیا) جهت تهیهی واکسن می گردد (۱۷). Marmur و همکاران ادعان داشتند که کریتیدیا می تواند پروتوزوئری باشد



شکل ۲. پروفایل های بانندی ایجاد شده از ژنوم نمونه های منطبق با *C. fasciulate* (۴۵۰ bp) به روش PCR-RFLP با آنزیم های *M.TaqI*، *DdeI*، *Scrfl*: نشانگر مولکولی ۵۰ bp. خط ۱: نمونهی استاندارد *C. fasciulate*. خط ۲: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *DdeI*. خط ۳: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *Scrfl*. خط ۵: شاهد منفی



شکل ۳. پروفایل های بانندی ایجاد شده از ژنوم نمونه های منطبق با *C. luciliae* (۴۰۰ bp) به روش PCR-RFLP با آنزیم های *M.TaqI*، *DdeI*، *Scrfl*: نشانگر مولکولی ۵۰ bp. خط ۱: نمونهی استاندارد *C. luciliae*. خط ۲: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *DdeI*. خط ۳: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *Scrfl*. خط ۴: پروفایل های بانندی ایجاد شده توسط آنزیم *TaqI*. خط ۵: شاهد منفی.

جهت تایپینگ ایزوله های تریپانوزوماتیده که پروفایل های آنزیمی آن ها برشی غیر مطابق با گونهی استاندارد را نشان داده بود، این نمونه ها جهت

TTTCTCTCTCAACTCTCTCTCTTGTGGGGGTGTTGTGTGTGGGGGTTTGTGCGCGCGG  
TGCCGGAACAAG GCCAATCGATGCACGTGTGTGTATTGTATTGTTCTTTCTT

شکل ۵. نتایج به دست آمده از ترتیب‌یابی محصول جایگاه ژنی ITS<sub>۱</sub> در ایزوله‌های منطبق با گونه‌ی استاندارد *C. fasciculata* (Accession Number emb | Y۰۰۰۵۵/۱ | )

TTTCTCTCTCAACTCTCTCTCTTGTGGGGGTGTTGTGTGTGGGGGTTTGTGCGCGCGG  
TGCCGGAACAAG GCCAATCGATGCACGTGTGTGTATTGTATTGTTCTTTCTT

شکل ۶. نتایج به دست آمده از ترتیب‌یابی محصول جایگاه ژنی در ایزوله‌های منطبق با گونه‌ی استاندارد *C. luciliae* ITS<sub>۱</sub> (Accession Number emb | AJ۶۲۷۰۱۸/۱ | )

TTTCTCTCTCAACTCTCTCTTTTGTGGGGGTGTTGTGTGTGGGGGTTTGTGCGCGCGGT  
GCCGGAACAAG GCCAATCGATGCACGTGTGTGTATTGTATTGTTCTTTCTT

شکل ۷. نتایج به دست آمده از ترتیب‌یابی محصول جایگاه ژنی در گونه‌ای از تریپانوزوماتیده منطبق با Accession number GQ۳۳۱۹۸۸

جدول ۵. توزیع فراوانی خانواده‌ی تریپانوزوماتیده‌ی جداسازی شده از کشت بیماران در دو منطقه‌ی اصفهان و حومه

منطقه	اصفهان تعداد (درصد)	حومه‌ی اصفهان تعداد (درصد)	کل تعداد (درصد)	جنس و گونه‌ی انگل
Accession number GQ۳۳۱۹۸۸	۸۰ (۷۷/۶۶)	۸۳ (۸۴/۶۹)	۱۶۳ (۸۱/۰۹)	تریپانوزوماتیده‌ی Accession number GQ۳۳۱۹۸۸
	۱۷ (۱۶/۵۰)	۱۰ (۱۰/۲۰)	۲۷ (۱۳/۴۴)	<i>Crithidia fasciculata</i>
	۶ (۵/۸۲)	۵ (۵/۱۱)	۱۱ (۵/۴۷)	<i>Crithidia luciliae</i>
	۱۰۳ (۵۱/۲۴)	۹۸ (۴۸/۷۶)	۲۰۱ (۱۰۰)	جمع

( $P < ۰/۰۰۱$ )

برونچی سپتیکا و بوردتلا یولیسس به صورت اندو سمیونت جداسازی نمود؛ بلکه می‌توان آن‌ها را از یک پشه به نام آئیدس و کسانس به خصوص کریتیدیا اونکوپلتی از یک حشره‌ی تغذیه کننده از یک شیرهی گیاهی (احتمالاً اونکوپلتوس فاسیاتوس) جداسازی نمود و کریتیدیایی به نام کریتیدیا دانئی از یک حشره‌ی شکارگر به نام زئولوسلئوگوراموس و کریتیدیایی به نام کریتیدیا دسوزایی از یک مگس تغذیه کننده از شهد گل‌ها به نام اورنیدیا اوبس جداسازی نمود. این محققان ادعان می‌دارند که ارتباطی بین این تک یاخته‌ها با گروه

که به صورت اندوسمیوز در داخل بعضی از باکتری‌ها مانند بوردتلا برونچی سپتیکا به سر می‌برد. همچنین این محققان بیان داشتند که این انگل علاوه بر باکتری پیش گفته، قادر است به صورت همزیست در داخل بوردتلا کولیسس نیز زندگی نماید. این محقق نتایج پژوهش‌های خود را با بررسی ژن‌های rRNA و منطقه‌ی SSURNA یعنی قسمتی از ژن ITS<sub>۱</sub> اثبات نموده است (۴).

Mundim و همکاران بیان داشتند که نه تنها کریتیدیایا را می‌توان از باکتری‌هایی مانند بوردتلا



Berzunza-Cruz و همکاران نشان دادند که هتروژنیسیته زیادی را به کمک روش PCR-RFLP می‌توان بین سویه‌های مختلف لیشمانیا و خانواده‌ی مربوط به آن‌ها یعنی خانواده‌ی تریپانوزوماتیده پیدا کرد و گونه‌های مختلف، تفاوت‌های مختلفی را نشان می‌دهند (۱۰). در پژوهش حاضر نیز با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP و به کار بردن آنزیم HaeIII مطابق شکل ۱ و پروفایل‌های باندهای ایجاد شده از ژنوم ایزوله‌ها، مشاهده شد که بر حسب تفاوت توالی ناحیه‌ی رونوشت‌برداری ITS۱ بین گونه‌های مختلف کریتیدیا، تفاوت وجود دارد؛ به طوری که تمام ایزوله‌هایی که پس از PCR و به کار بردن آنزیم HaeIII باندهای ۴۵۰ bp را آشکار کرده بودند، از نظر توالی ژنی ITS۱ مشابه کریتیدیا فاسیکولاتا و تمامی ایزوله‌هایی که پس از PCR و به کار بردن آنزیم HaeIII باندهای ۴۰۰ bp را آشکار کرده بودند، از نظر توالی ژنی ITS۱ مشابه کریتیدیا لوسیلیا بودند.

Yang و همکاران بیان نمودند که همانند بیشتر انگل‌ها، بررسی روابط فیلوژنتیک جنس‌های مختلف انگل لیشمانیا و انگل کریتیدیا خیلی پیچیده است؛ زیرا تعریف و مرزبندی زیرگونه‌ها برای توصیف آن‌ها بسیار مشکل است. آنان ۱۷ ایزوله‌ی لیشمانیا و ۲ ایزوله‌ی کریتیدیا را از مناطق مختلف کشور چین جمع‌آوری نمودند و با به کار بردن تکنیک PCR ژن ریپوزومی ITS۱ را تکثیر نمودند. سپس با توالی‌یابی تعدادی از ایزوله‌ها نه تنها به تاکسونومی آن‌ها اقدام نمودند، بلکه قرابت‌های فیلوژنتیک بین گونه‌های لیشمانیا و سایر انگل‌ها را نیز مشخص کردند (۲۰). البته شایان ذکر است که در جریان استفاده از آنزیم‌های DdeI، SrfI و TaqI بر روی تمامی

بزرگی از حشرات مربوط به خانواده‌های دیپتران و همیتران، سبب شگفتی‌های زیادی در مورد این تک‌یاخته شده است (۵).

de Souza و همکاران بیان داشتند که کریتیدیاها قادرند در داخل برخی از انگل‌ها مربوط به خانواده‌ی تریپانوزوماتیده، زیر خانواده‌ی لیشمانیاها به صورت اندوسمبیوز به سر برند و همراه با آن‌ها، به میزبان‌های مختلف منتقل شوند. این محقق بهترین تفکیک کریتیدیاها از لیشمانیاها را جداسازی ژن‌های rDNA و یا rRNA آن‌ها دانست و بیان نمود که با استخراج DNA کیتو پلاستی و یا DNA ریپوزومی و سپس تکثیر آن به کمک PCR و در نهایت با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و با کمک آنزیم HaeIII و جداسازی باندهای ۳۵۰ bp برای لیشمانیاها و باندهای ۴۵۰ bp برای کریتیدیاها، می‌توان این انگل را از خانواده‌ی تریپانوزوماتیده تفکیک نمود (۱۹).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز تا حدودی با نتایج de Souza و همکاران هماهنگی و مطابقت دارد؛ زیرا بر اساس جدول ۵ که توزیع فراوانی خانواده‌ی تریپانوزوماتیده‌ی جداسازی شده از کشت بیماران دارای لیشمانیوز جلدی در دو منطقه‌ی اصفهان و حومه را نشان می‌دهد، تعداد زیادی از نمونه‌ها (۱۶۳ نمونه یا ۸۱/۰۹ درصد) پس از PCR و با استفاده از آنزیم HaeIII دو باندهای ۴۵۰ و ۴۰۰ bp را نشان دادند که پس از توالی‌یابی چند نمونه به صورت اتفاقی، نتایج آنالیز مولکولی با نرم‌افزار Blast، ۹۲ درصد مشابهت با کریتیدیا فاسیکولاتا و ۸۹ درصد مشابهت با کریتیدیا لوسیلیا را نشان داد و توالی این ژن در بانک جهانی ژن با کد GQ۳۳۱۹۸۸ مطابقت داشت که توسط دودی و همکاران بیان شده بود (۲).

هستند، بایستی تحقیق و تفحص بیشتری صورت گیرد. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند مورد استفاده‌ی پزشکان به خصوص متخصصین پوست برای درمان صحیح بیماری لیشمانیوز پوستی قرار گیرد و راه‌گشای مسیری جهت تهیه‌ی واکسن لیشمانیوز پوستی باشد.

### تشریح و قدردانی

از مسؤولین محترم مراکز تحقیقاتی پوست و سالک حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به ویژه سرکار خانم مهندس شادی شاهسار تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۰۱/۲۸۲۰۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می‌باشد و به کمک حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

ایزوله‌ها در مقایسه با نمونه‌های استاندارد، هیچ گونه تفاوتی در شکست پروفایل‌های بانندی مشاهده نشد. چنین به نظر می‌آید که آنزیم HaeIII در این پژوهش برای تفکیک گونه‌های کریتیدیا نقش کلیدی بازی کرده است.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، از نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر می‌توان چنین استنتاج نمود که جنس کریتیدیا به عنوان آلوده‌کننده‌ی کشت‌های لیشمانیا که برای اولین بار در کشور ایران و در منطقه‌ی اصفهان مورد بررسی قرار گرفت، دارای پلی مورفیسم ژنتیکی است و این نتایج نشان می‌دهد که اپیدمیولوژی مولکولی این آلوده‌کننده، ارتباط مستقیمی با الگوهای PCR-RFLP دارد؛ اما از نظر ارتباط این الگوها با سایر مناطق جغرافیایی کشور ایران که برای انگل لیشمانیا به خصوص لیشمانیاماژور جزء مناطق هایپر آندمیک

### References

1. World Health Organization. Control of the leishmaniases [Online]. [cited 2010 Mar 22]; Available from: URL: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)
2. Doudi M, Hejazi SH, Razavi MR, Narimani M, Khanjani S, Eslami G. Comparative molecular epidemiology of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* by PCR-RFLP technique in hyper endemic cities of Isfahan and Bam, Iran. *Med Sci Monit* 2010; 16(11): CR530-CR535.
3. Garrity G, Brenner DJ, Staley JT, Krieg NR, Boone DR, De Vos P, et al. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer; 2006. p. 795-836.
4. Marmur J, Cahoon ME, Shimura Y, Vogel HJ. Deoxyribonucleic Acid Type attributable to a Bacterial Endosymbiote in the Protozoan *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. *Nature* 1963; 197: 1228-9.
5. Mundim MH, Roitman I, Hermans MA, Kitajima EW. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. *J Protozool* 1974; 21(4): 518-21.
6. Baker JR, Muller R, Rollinson D. *Advances in Parasitology*. London, UK: Academic Press; 1998. p. 215-40.
7. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 2007; 25(2): 203-11.
8. Banuls AL, Brisse S, Sidibe I, Noel S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitol (Praha)* 1999; 46(1): 10-4.
9. El Tai NO. Molecular approaches to direct diagnosis and characterization of *Leishmania donovani* [Thesis]. Berlin, Germany: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Der Humboldt-Universität zu Berlin 2002.
10. Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa CT, Perez-Montfort R, Becker I.

- Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 2002; 88(10): 918-25.
11. Du Y, Chang KP. PCR amplification and sequence analysis of pre-ribosomal RNA genes from *Crithidia endosymbionts*, p. 499-504. In: Sato S, Ishida M, Ishikawa H, editors. *Endocytobiology*. Tiubingen, Germany: Tubingen University Press; 1993.
  12. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, Schonian G, Farajnia S, et al. *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Trop* 2006; 98(1): 52-8.
  13. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Hajjarian H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J Publ Health*, 2008; 37(1): 54-60.
  14. Schonian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratlong F, et al. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 106(2): 239-48.
  15. Schonian G, Schnur L, El Fari FM, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Kohler W, et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95(2): 217-24.
  16. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G, Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(5): 663-8.
  17. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47(1): 349-58.
  18. Wang JR, Lee ST, Juan WH, Chuang WL, Hung SI, Chung WH, et al. Indigenous leishmaniasis in Taiwan: report of a case. *Int J Dermatol* 2008; 47(1): 40-3.
  19. de Souza W, Motta MC. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 173(1): 1-8.
  20. Yang BB, Guo XG, Hu XS, Zhang JG, Liao L, Chen DL, et al. Species discrimination and phylogenetic inference of 17 Chinese *Leishmania* isolates based on internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. *Parasitol Res* 2010; 107(5): 1049-65.

## The Molecular Epidemiology of *Crithidia* Strains in Isfahan City and Surrounding Areas, Iran

Monir Doudi PhD<sup>1</sup>, Mahbubeh Setorki PhD<sup>2</sup>, Gilda Eslami PhD<sup>3</sup>, Seyed Hossein Hejazi PhD<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Genotyping of *Crithidia* species is of high importance in the selection of an appropriate method to control and prevent cutaneous leishmaniasis (CL), determination of the best therapeutic effect of drugs, and preparation and evaluation of the vaccines.

**Methods:** In order to identify the strains of *Crithidia*, sampling was done in one of the endemic regions of wet or rural type zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) in Isfahan city and surrounding areas, Iran. Samples were 602 patients with wet cutaneous leishmaniasis referred to Isfahan Leishmaniasis Research Center or other health centers in the vicinity of Isfahan. Sampling in Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) medium, extraction of DNA from promastigotes, implementation of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, amplification of internal transcribed spacer (ITS1), and application of HaeIII enzyme were performed.

**Findings:** 201 patients (33.39%) were found with two species of *Crithidia*, 27 cases of *Crithidia fasciculata* (13.44%) and 11 cases of *Crithidia luciliae* (5.47%). The rest of the cases, however, were *trypanosomatidae* with accession number of *GQ331988*; molecular analysis showed 92% had tendency of homology with *Crithidia fasciculata* and 89% with *Crithidia luciliae* (163 cases or 81.9%). Out of 351 patients (58.31%), leishmaniasis parasite was isolated, and out of 50 patients (8.31%), neither *Leishmania* nor *Crithidia* were isolated; therefore, their report was negative following cultured samples.

**Conclusion:** The results of the present study suggested that *Crithidia* not only contaminates *leishmania* culture but also enjoys genetic polymorphism in Isfahan and surrounding areas.

**Keywords:** Polymorphism, *Crithidia*, Internal transcribed spacer (ITS1), Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

**Citation:** Doudi M, Setorki M, Eslami G, Hejazi SH. **The Molecular Epidemiology of *Crithidia* Strains in Isfahan City and Surrounding Areas, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(275): 182-93

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Biology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Izeh Branch, Izeh, Iran

3- Assistant Professor Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

4- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Monir Doudi PhD, Email: doudi@iaufala.ac.ir

## کولیت ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس به همراه کولیت اولسراتیو؛ گزارش یک مورد نادر

دکتر رحمت اله رفیعی<sup>۱</sup>، نوید شریفی<sup>۲</sup>

### گزارش مورد

#### چکیده

**مقدمه:** ویروس هرپس سیمپلکس (Herpes simplex virus یا HSV) یک ویروس بیماری‌زا است که به ندرت می‌تواند دستگاه گوارش را به خصوص در افرادی که زمینه‌ی سرکوب ایمنی داخلی یا خارجی دارند، درگیر کند.

**معرفی بیمار:** بیمار، مرد ۲۶ ساله‌ای با سابقه‌ی قبلی کولیت اولسراتیو است که با شکایت از حملات شدید دل درد، هماتوئیزی مقاوم به درمان و مصرف همزمان داروهای سرکوب‌گر ایمنی مراجعه کرده است. پس از شک و بررسی، عامل حملات حاد بیماری، ویروس هرپس سیمپلکس شناخته شد و بیمار تحت درمان با داروی Acyclovir قرار گرفت و پس از چند روز علائم وی بهبود یافت.

**نتیجه‌گیری:** امروزه، ویروس هرپس سیمپلکس به عنوان یکی از علل حملات برق‌آسا و یا مقاومت بیماری‌های التهابی روده به درمان‌های تعدیل‌کننده‌ی ایمنی مطرح است که می‌توان با استفاده از روش‌های Immunohistochemistry و Polymerase chain reaction نمونه‌ی بافتی، آن را شناسایی کرد و با درمان ضد ویروسی به موقع، از حملات و آسیب‌های شدید بیماری جلوگیری نمود.

**واژگان کلیدی:** ویروس هرپس سیمپلکس، بیماری التهابی روده، کولیت اولسراتیو، آسیکلوویر

**ارجاع:** رفیعی رحمت اله، شریفی نوید. کولیت ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس به همراه کولیت اولسراتیو؛ گزارش یک مورد نادر.

مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۵): ۱۹۴-۲۰۰

#### مقدمه

عفونت با ویروس هرپس سیمپلکس (HSV یا Herpes simplex virus)، در سراسر جهان شایع است؛ به طوری که بیش از ۹۰ درصد مردم دنیا تا دهه‌ی چهارم زندگی، برای HSV سرم مثبت می‌شوند (۱). در بیماران نقص ایمنی شامل مبتلایان به بیماری التهابی روده (Inflammatory bowel disease یا IBD) عفونت شدید و منتشر با HSV گزارش شده

است (۲). همچنین در این افراد، HSV شناسایی بیشتری برای منتشر شدن دارد (۳).

در بیماران مبتلا به IBD، به طور قابل توجهی خطر عفونت HSV ناشی از درمان با تعدیل‌کننده‌های ایمنی، افزایش یافته است (۴). این داروهای سرکوب‌کننده‌ی ایمنی شامل کورتیکواستروئیدها، آزوتیوپرین، سیکلوسپورین، متوترکسات یا تاکرولیموس می‌باشند. همچنین در بیماران IBD، عود

۱- استادیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف‌آباد و بیمارستان دکتر علی شریعتی، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف‌آباد، اصفهان، ایران

در حدود ۳ ماه پیش از مراجعه‌ی بیمار، بر روی پوست اندام تحتانی وی چندین راش قرمز رنگ به قطر ۵ میلی‌متر و هم سطح با پوست به وجود آمده بود و پس از گذشت چند روز خودبه‌خود از بین رفته بود. بیمار در همان زمان برای اولین بار به کلینیک مراجعه کرده و مورد بررسی کلونوسکوپی قرار گرفته بود که پس از انجام بیوپسی و بررسی‌های پاتولوژیک، تشخیص قطعی کولیت اولسراتیو برای وی گذاشته شد. در این مدت، بیمار تحت درمان با Asacol بود و در هنگام حملات هماتوئیزی به طور متناوب از کورتیکواستروئیدها نیز استفاده می‌کرد و علائم وی به نسبت تحت کنترل بود. بیمار از سال گذشته کاهش وزن محسوسی را بیان کرده است، اما دچار خستگی زودرس و تنگی نفس فعالیتی و حملات دل درد و هماتوئیزی مکرر می‌شده است.

بیمار با شکایت هماتوئیزی و اسهال غیر قابل کنترل که از حدود ۱۰ روز پیش شروع شده بود، به کلینیک بیمارستان دکتر شریعتی اصفهان مراجعه کرد. علائم حیاتی وی در حد طبیعی بود و تب نداشت. در معاینه، ملتحمه‌ی بیمار رنگ پریده بود. شکم وی نرم و بدون تندرns و گاردینگ بود و در لمس، کبد و طحال وی به دست نمی‌خورد و هیچ گونه ضایعه‌ی پوستی و مفصلی رؤیت نشد.

در آزمایش‌های اخیر بیمار، آنمی خفیف ( $\text{gr/dl}$ )  $\text{HGB} = 11/7$ ،  $\text{RBC} = 5/56 \times 10^6$  و  $\text{HCT} = 38/6$  درصد (هایپوکروم، میکروسیتیک  $\text{MCV} = 69/4 \text{ FL}$  و  $\text{MCH} = 21/1 \text{ pg}$ ) از نوع فقر آهن ( $\text{Iron} = 21$ ،  $\text{TIBC} = 490$  و  $\text{Ferritin} = 27$ ) همچنین لکوسیتوز ( $64/3$  درصد  $\text{Neut}$  و  $\text{WBC} = 15600$ ) دیده می‌شد. نتایج کبدی، کلیوی،

عفونت، به خصوص در افرادی که با چند عامل سرکوب‌گر ایمنی مواجه شده‌اند، بیشتر گزارش شده است (۵-۶). عود HSV می‌تواند باعث ایجاد عفونت‌های سیستمیک شدید مانند انسفالیت، مننژیت، پنومونی، ازوفازیت، کولیت یا هپاتیت شود که با مرگ و میرقابل توجهی همراه است (۷-۸). کولیت ناشی از HSV، حتی در بیماران IBD، بسیار نادر است؛ اما می‌تواند علت یا تقلید کننده‌ی یک حمله‌ی حاد باشد (۸-۱۱)، که برای آن خطر بالای کولکتومی وجود دارد (۸).

در این مقاله یک مورد کولیت ناشی از HSV که به عنوان یک عارضه برای کولیت اولسراتیو بیمار به وجود آمده است، معرفی می‌گردد.

### معرفی بیمار

بیمار مردی ۲۶ ساله ساکن دولت‌آباد اصفهان بود که از حدود ۳ سال پیش دچار دردهای شدید در ناحیه‌ی هایپوگاستر چپ و راست همراه با دفع خون روشن در مدفوع بوده است. دل دردهای بیمار با خوردن بعضی مواد غذایی مانند ماکارونی بدتر می‌شده است و با دفع مدفوع، دل درد بیمار پس از گذشت ۱۰ دقیقه بهبود می‌یافته است. در سوابق درمانی بیمار، یک کلونوسکوپی دیده شد که برای رد کردن کولیت اولسراتیو انجام شده بود و در آن، در آنوس و ۱۰ سانتی‌متری فوقانی آن اریتم شدید و زخم وجود داشت. اما در بررسی پاتولوژیک آن مخاط روده‌ی بزرگ مشهود بود و در آن ارتشاح سلول‌های التهابی حاد و مزمن به همراه هایپرمی لامینا پروپریا وجود داشت و تشخیص آن، کولیت غیر اختصاصی اعلام شده بود.

انعقادی والکترولیت‌های بیمار، در حد طبیعی گزارش شده بود.

آزمایش مدفوع بیمار از لحاظ پارازیت‌ها منفی بود، قوام آبکی داشت و همچنین یک تا دو عدد گلبول سفید و مقدار زیادی گلبول قرمز در آن ذکر شده بود. با توجه به این که بیمار در چند ماه اخیر چند مرتبه با حملات هماتوئیزی و دل درد مراجعه کرده بود و با مصرف کورتیکواستروئیدها و Asacol و Azathioprine بهبودی نیافته بود، در نهایت موجب شد عفونت‌های ویروسی دستگاه گوارش مشکوک باشد و آزمایش آنتی بادی بر علیه CMV (Cytomegalovirus) و HSV درخواست شود که در آن آنتی بادی HSV (IgM) بالاتر از حد طبیعی و آنتی بادی IgG آن زیر حد طبیعی گزارش شد و برای CMV فقط آنتی بادی از نوع IgG بالاتر از حد طبیعی بود و آنتی بادی IgM طبیعی بود. در نهایت، با توجه به مثبت شدن IgM بر علیه ویروس HSV، برای تأیید تشخیص و فعال بودن ویروس HSV، برای بیمار آزمایش یا PCR (Polymerase chain reaction) نیز درخواست شد که متأسفانه بیمار قادر به انجام آن نبود.

بنابراین، بیمار بلافاصله پس از مثبت شدن آنتی بادی HSV (IgM)، تحت درمان با قرص Acyclovir قرار گرفت و از دوز کورتیکواستروئید وی کاسته شد که از آن پس، بیمار به درمان پاسخ مطلوب داد و علایمش بهبود یافت.

### بحث

امروزه علت قطعی IBD هنوز روشن نشده است؛ اما مطالعات مختلف برای شروع و پیشرفت این بیماری

وجود استعداد ژنتیکی، تحریک به وسیله آنتی ژن‌های باکتری‌های داخل روده‌ای، ادجوانت‌ها (تحریک کننده‌های پاسخ ایمنی غیر اختصاصی) و حملات محرک‌های محیطی را که باعث شکسته شدن سد مخاطی روده می‌شوند، ضروری دانسته‌اند (۱۲-۱۳).

گاهی اوقات بیماران IBD به درمان‌های معمول مقاوم و یا دچار حملات برق‌آسا می‌شوند، که باید به فکر عوامل عفونی سوار شده بر روی بیماری IBD از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها بود. ویروس‌های درگیر کننده‌ای که تا کنون گزارش شده‌اند، شامل Cytomegalovirus (۱۴-۱۵)، Epstein-barr virus B۱۹ Human parvovirus (۱۶)، Herpes simplex (۱۷) و (۱۸) هستند.

درگیری دستگاه گوارش بالغین با ویروس HSV بسیار نادر است (۱۹) و اغلب در زمینه‌ی سرکوب ایمنی داخلی و خارجی دیده می‌شود (۸) و همراه با مرگ و میر قابل توجهی است که به طور معمول در اتوپسی تشخیص داده می‌شود (۲۰-۲۱).

شیوع جهانی HSV-type ۱ تا دهه‌ی چهارم ۹۸-۴۵ درصد است (۲۲) و شیوع سرولوژی ۲ HSV-type هم زمان با سن شروع فعالیت جنسی در نوجوانان و بزرگسالان افزایش می‌یابد (۲۳). مری، پیرنه و رکتوم شایع‌ترین محل‌های درگیر در دستگاه گوارش است که به ندرت به صورت کولیت منتشر هم دیده می‌شود (۲۴). تا به حال گزارش‌های اندکی از همراهی بیمار کولیت اولسراتیو با کولیت ناشی از HSV گزارش گردیده است (۸، ۱۰)، که هیچ یک از ایران نبوده است.

Schunter و همکاران موردی از شعله‌ور شدن کولیت اولسراتیو ناشی از ویروس HSV-type ۲ را در

است؛ با این حال، عدم وجود این علائم، احتمال عفونت با HSV را رد نمی‌کند که به علت درگیری موضعی ویروس است (۱۹).

در عفونت با HSV علامت‌دار، Acyclovir (آنالوگ Nucleoside) مؤثر است (۲۶). این آنالوگ پس از برداشت داخل سلولی و تبدیل شدن به آسیکلوویر تری فسفات، با مهار آنزیم پلیمرز ویروسی به صورت انتخابی، از رونویسی ویروس هرپس جلوگیری می‌نماید (۲۷). Valacyclovir، Penciclovir و Famciclovir نیز می‌توانند با همین روش مؤثر واقع شوند. درمان سرکوب‌گر ایمنی ممکن است باعث بدتر شدن عفونت HSV شود و درمان‌های تعدیل‌کننده‌ی ایمنی نباید در عفونت فعال آغاز شوند (۳). اما عفونت گذشته یا نهفته‌ی HSV مانعی برای درمان‌های تعدیل‌کننده‌ی ایمنی نمی‌باشد (۵).

Chevaux و Peyrin-Biroulet قطع درمان استروئیدی و شروع درمان آنتی ویروسی را منجر به برطرف شدن سریع دل درد و مدفوع خونی بیماران می‌دانند (۲۸). در بیمار مورد مطالعه نیز به علت عدم پاسخ به درمان‌های معمول کولیت اولسراتیو، بالا بودن Anti HSV-IgM و کاهش علائم بیمار پس از مصرف Acyclovir، تشخیص وجود ویروس فعال مورد تأیید قرار گرفت.

### نتیجه‌گیری

HSV می‌تواند به عنوان یکی از علل حملات برق‌آسا و یا مقاومت بیماران IBD به درمان‌های تعدیل‌کننده‌ی ایمنی باشد. بنابراین همیشه در مواردی که بیمار با وجود مصرف داروهای تعدیل‌کننده‌ی ایمنی

خانم ۳۵ ساله‌ای گزارش کردند (۸). همچنین Blaszyk و همکاران (۱۰) نیز یک مورد کولیت HSV را در یک خانم مبتلا به کولیت اولسراتیو مقاوم به درمان، از یک نمونه بافت کلون به روش Immunohistochemistry یا IHC گزارش نمودند. علائم کولیت ناشی از HSV با سایر علل کولیت تفاوت قابل افتراقی ندارد و شامل اسهال آبکی خونی، درد کرامپی شکم، تب، آرترالژی، تهوع، کاهش اشتها و کاهش وزن است (۲۵). به همین دلیل، یک راه تشخیص سریع و مطمئن برای کولیت ناشی از HSV لازم است، تا بتوان بدون اتلاف وقت، درمان آنتی ویروسی را آغاز کرد و مرگ و میر ناشی از آن را کاهش داد (۸).

روش استاندارد طلایی برای تشخیص عفونت با HSV، PCR یا IHC (Immunohistochemistry) بافت متأثر است؛ اما در صورت وجود تیترا بالای Anti HSV-IgG، ظاهر شدن Anti HSV-IgM و یا افزایش تیترا Anti HSV-IgG نشانه‌ی عود عفونت با HSV است (۲۲) که بیمار مورد مطالعه نیز Anti HSV-IgM مثبت داشت.

یافته‌های کلونوسکوپی می‌تواند شامل قرمزی و شکنندگی مخاط، زخم‌های آفتی، ضایعات التهابی پولیپوئیدی کاذب و زخم‌های نکروزه باشد (۱۹)، که برخی از آن‌ها در بیمار حاضر نیز دیده شد. ارزیابی‌های میکروسکوپی نمونه‌ها، می‌تواند ضایعات التهابی را از یک ادم واضح در لامینا پروپریا با ترشح لنفوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها تا زخم‌های عمقی مخاطی نشان دهد. هسته‌ی داخل سلولی اتوزینوفیلیک (Cowdry type A) و چند هسته‌ای شدن بعضی از سلول‌های اپیتلیال، معرف کولیت ناشی از هرپس



سرکوب‌گر ایمنی باشد و دچار عفونت HSV علامت‌دار شود، باید سریع درمان آنتی ویروسی (Valacyclovir, Penciclovir و Famciclovir و ...) را آغاز نمود و داروهای تعدیل‌کننده ایمنی را نیز تا بهبود علائم، قطع نمود.

دچار حمله‌ی شدید و مقاوم به درمان شده است، می‌بایست ابتدا با یکی از روش‌های IHC و یا PCR نمونه‌ی بافت، کولیت ناشی از HSV را رد کرد و سپس دوز داروهای سرکوب‌گر ایمنی را افزایش داد. در صورتی که بیمار IBD مصرف‌کننده‌ی داروهای

## References

- Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, Lee FK, Nahmias AJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA* 2006; 296(8): 964-73.
- Baumgart DC. Crohn's disease and ulcerative colitis: from epidemiology and immunobiology to a rational diagnostic and therapeutic approach. New York, NY: Springer; 2012. p. 648.
- Slifkin M, Doron S, Snyderman DR. Viral prophylaxis in organ transplant patients. *Drugs* 2004; 64(24): 2763-92.
- Abera FN, Lichtenstein GR. Methods to avoid infections in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(7): 685-95.
- Rahier JF, Ben-Horin S, Chowers Y, Conlon C, De MP, D'Haens G, et al. European evidence-based Consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2009; 3(2): 47-91.
- Toruner M, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, et al. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008; 134(4): 929-36.
- Zamani F, Mohamadnejad M. Herpes simplex virus encephalitis during immunosuppressive treatment of ulcerative colitis. *Med Gen Med* 2004; 6(4): 7.
- Schunter MO, Walles T, Fritz P, Meyding-Lamade U, Thon KP, Fellermann K, et al. Herpes simplex virus colitis complicating ulcerative colitis: A case report and brief review on superinfections. *J Crohns Colitis* 2007; 1(1): 41-6.
- el-Serag HB, Zwas FR, Cirillo NW, Eisen RN. Fulminant herpes colitis in a patient with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22(3): 220-3.
- Blaszcyk H, Hyman NH, Cooper K. Herpes simplex virus colitis in ulcerative colitis, simulating malignancy. *Histopathology* 2006; 49(3): 316-8.
- Ruther U, Nunnensiek C, Muller HA, Rupp W, Gforer S, Bader H, et al. [Herpes simplex-associated exacerbation of Crohn's disease. Successful treatment with acyclovir]. *Dtsch Med Wochenschr* 1992; 117(2): 46-50.
- Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126(6): 1504-17.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 417-29.
- Goodgame RW. Gastrointestinal cytomegalovirus disease. *Ann Intern Med* 1993; 119(9): 924-35.
- Papadakis KA, Tung JK, Binder SW, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, et al. Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(7): 2137-42.
- Watanabe T. Ulcerative colitis that developed 8 years after human parvovirus B19 encephalopathy. *Eur J Pediatr* 2004; 163(6): 341-2.
- Gehlert T, Devergne O, Niedobitek G. Epstein-Barr virus (EBV) infection and expression of the interleukin-12 family member EBV-induced gene 3 (EBI3) in chronic inflammatory bowel disease. *J Med Virol* 2004; 73(3): 432-8.
- Wakefield AJ, Fox JD, Sawyerr AM, Taylor JE, Sweenie CH, Smith M, et al. Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease using the nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 38(3): 183-90.
- Colemont LJ, Pen JH, Pelckmans PA, Degryse HR, Pattyn SR, Van Maercke YM. Herpes simplex virus type 1 colitis: an unusual cause of diarrhea. *Am J Gastroenterol* 1990; 85(9): 1182-5.
- Buss DH, Scharjy M. Herpesvirus infection of the esophagus and other visceral organs in adults. incidence and clinical significance. *Am J Med* 1979; 66(3): 457-62.
- Matsumoto J, Sumiyoshi A. Herpes simplex

- esophagitis--a study in autopsy series. *Am J Clin Pathol* 1985; 84(1): 96-9.
22. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57(5): 737-63.
23. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet* 2007; 370(9605): 2127-37.
24. Smith JO, Sterling RK, Mills AS, Stravitz RT, Luketic VA, Fuchs M, et al. Herpes simplex virus colitis in a patient with Crohn's disease and hepatitis B and d cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2010; 6(2): 120-2.
25. Dray X, Treton X, Mazon MC, Lavergne-Slove A, Joly F, Mimram D, et al. Herpes simplex virus type 1 colitis in a patient with common variable immunodeficiency syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18(5): 541-4.
26. Fillet AM. Prophylaxis of herpesvirus infections in immunocompetent and immunocompromised older patients. *Drugs Aging* 2002; 19(5): 343-54.
27. Whitley RJ, Gnann JW, Jr. Acyclovir: a decade later. *N Engl J Med* 1992; 327(11): 782-9.
28. Chevaux JB, Peyrin-Biroulet L. Herpes simplex virus colitis complicating the course of a patient with Crohn's disease and cirrhosis: an underestimated association? *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2010; 6(2): 122-4.

## Herpes Simplex Induced Colitis Complicating Ulcerative Colitis: A Case Report

Rahmatollah Rafiei MD<sup>1</sup>, Navid Sharifi<sup>2</sup>

### Case Report

#### Abstract

**Background:** Herpes simplex virus (HSV) is a virus rarely can involve the gastrointestinal tract, particularly in individuals with underlying endogenous or exogenous immunosuppressant.

**Case Report:** Patient, a 26-year old man with a history of ulcerative colitis was referred with severe abdominal pain, treat-refractory hematochezia and use of simultaneous immunosuppressive drug. Once suspected and investigated, HSV was known to be the cause of the acute episode. Therefore, the patient underwent treatment with acyclovir whereupon in a matter of days his symptoms healed.

**Conclusion:** Today, HSV is considered as the cause of fulminant attack or resistance of inflammatory bowel diseases to immunomodulator treatment; it can be identified using immunohistochemistry and polymerase chain reaction of tissue samples. Timely antiviral therapy can prevent severe attacks and damage.

**Keywords:** Herpes simplex virus (HSV), Inflammatory bowel disease, Ulcerative colitis, Acyclovir

**Citation:** Rafiei R, Sharifi N. **Herpes Simplex Induced Colitis Complicating Ulcerative Colitis: A Case Report.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(275): 194-200

1- Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Shariati Hospital, Islamic Azad University, Najafabad Branch, Isfahan, Iran

2- Student of Medicine, Islamic Azad University, Najafabad Branch, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Navid Sharifi, Email: navidsharifi@smd.iaun.ac.ir

errors author should verify references against the original documents. The Reference should provide the following information as stated in the presented models as follows:

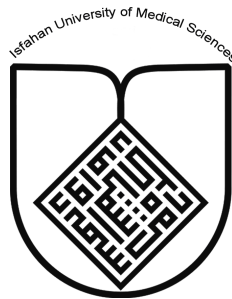
- a. **Article:** Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
  - b. **Chapter in a book:** Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
  - c. **Book:** Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
14. **Proof Reading:** A computer prints out is sent to the corresponding author for proof reading before publication in order to avoid any mistakes. Corrections should be marked clearly and sent immediately to the Journal office.
  15. **Abbreviations and symbols:** Use only standard abbreviations. **Avoid using them in the title and abstract.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
  16. The **corresponding author:** Will be supplied with 1 free issue.
  17. **Ethical guidelines:** Ethical considerations must be addressed in the Materials and Methods. Please state that **informed consent** was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project. Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your Institute or agency.
  18. **Conflicts of interest:** Authors must acknowledge and declare any sources of funding and potential conflicting interest, such as receiving funds or fees by, or holding stocks and shares in, an organization that may profit or lose through publication of your paper. Declaring a competing interest will not lead to automatic rejection of the paper, but we would like to be made aware of it.
  19. **Page charges:** There are no charges for publication in this Journal.
  20. **Copyright:** The entire contents of the Journal of Isfahan Medical School are protected under international copyrights. This Journal is for your personal noncommercial use. You may not modify copy, distribute, transmit, display, or publish any materials contained on the Journal without the prior written permission of it or the appropriate copyright owner.
  21. **Peer review process:** All manuscripts are considered to be confidential. They are peer-reviewed by at least 3 anonymous reviewers selected by the Editorial Board. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor decision to accept, reject, or require modifications. If the manuscript is completely acceptable according to the criteria set forth in these instructions, it is scheduled for the next available issue.
  22. Journal has entire right for accept or reject any of received manuscripts.
  23. The editors, editorial board, sponsoring organization, and publisher do not accept responsibility for the statements expressed by authors in their contributions.
  24. **Communicating with the Editorial Office:** We encourage you to communicate with the JIMS Editorial Office and to check on the status of a manuscript via journal site: (<http://journals.mui.ac.ir/jims>) only. For more in formations you can contact with JIMS office via E-mail address ([jims@med.mui.ac.ir](mailto:jims@med.mui.ac.ir)).

## INSTRUCTION TO AUTHORS

1. **Aims and Scope:** The Journal of Isfahan Medical School is the official scientific **weekly** publication of the Faculty of Medicine in Isfahan Medical Sciences University.  
This Journal accepts Original Papers, Review Articles, Case Reports, Short Communications, Educational Medical Video Clips and Letters to the Editor on all aspects of medicine.
2. Manuscript **Submission is acceptable only via Journal URL: <http://journals.mui.ac.ir/jims>**  
Manuscript must be accompanied by a covering letter to the Editor-in-Chief, including title and author(s) name and undertaking that it has not been published or submitted elsewhere. In case the manuscript was earlier submitted to some other Journal and was rejected, the authors must provide full information for proper analysis. Manuscript should be typed in double space of the A-4 size paper with clear margins on both sides. The text should be submitted in Microsoft Word format only. Tables as well as illustrations should be typed and drawn on a separate pages. Do not submit tables as photographs.  
The figures should be sent in a format of JPEG or GIF which will produce high quality images in the online edition of the journal. Authors must declare that it is being exclusively contributed to the Journal of Isfahan Medical School.
3. The manuscript should include: **Title page**, the **Abstract** (in both Farsi and English), **Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion, Acknowledgement and References**.
4. **The title page:** The complete title of the manuscript, the name of all the authors with their highest qualifications, the department or institution to which they are attached, address for correspondence with telephone numbers, e-mail, and Fax number.
5. The **Abstract:** All original articles must accompany a structured abstract up to 250 words. It should be structured as **Background, Methods, Results and Conclusion** followed by **3 to 5 Keywords**. Keywords will assist indexers in cross indexing the article as they are published with abstract. Use terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of index medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Authors need to be careful that the abstract reflects the content of the article accurately.
6. **Introduction:** This should summarize the purpose and the rationale for the study. It should neither review the subject extensively nor should it have data or conclusions of the study.
7. **Materials & Methods:** This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is used, its manufacturer's name and address should be given in parenthesis. If the method is established, give reference but if the method is new, give enough information so that another author is able to perform it. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. For patients, age, sex with mean age  $\pm$  standard deviation must be given. Statistical method must be mentioned and specify any general computer program used.
8. **Results:** It must be presented in the form of text, tables and illustrations. The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion parts) to clarify their contents.
9. **Discussion:** This should emphasize the present findings and the variations or similarities with other work done in the field by other workers. The detailed data should not be repeated in the discussion again. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. It must be mentioned whether the hypothesis mentioned in the article is true, false or no conclusions can be derived.
10. **Acknowledgement:** All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgement section. It should include persons who provided technical help, writing assistance and departmental head who only provided general support. Financial and material support should also be acknowledged.
11. **Tables:** In limited numbers should be submitted with the **captions placed above**. Do not submit tables as photograph. Place explanatory matters in footnotes, not in the heading.
12. **Figures:** Should be in limited numbers, with high quality art work and mounted on separate pages. The captions **should be placed below**. The same data should not be presented in tables, figures and text, simultaneously.
13. **References:** Should be as **Vancouver style**. All manuscripts should be accompanied by relevant references. The author should ensure reference to locally published studies by doing proper literature search. It may not be possible for the editor and reviewers to check the accuracy of all reference citations. To minimize such

### ***Editorial Board (In alphabetical order)***

1. **Mojtaba Abtahi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada
3. **Mohammad Esmail Akbari** MD, Professor of Thoracic Surgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. **Reza Amin** MD, Professor of Pediatrics, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. **Babak Amra** MD, Professor of Pulmonology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6. **Saeid Andalib Jortani** MD, Professor of Pathology, Lewis Weil University, USA
7. **Gholam Reza Askari** MD, PhD of Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
8. **Reza Bagherian-Sararoudi** PhD, Assistant Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
9. **Majid Berekatain** MD, Associate Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
10. **Ken Bassett** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
11. **Ahmad Chitsaz** MD, Associate Professor of Neurology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
12. **Afsoon Emami** MD, Associate Professor of Nephrology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
13. **Ali Reza Emami** MD, Associate Professor of Infectious Diseases, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
14. **Shahin Emami** Biochemistry and Endocrinology, Saint Antoine Hospital, France
15. **Ebrahim Esfandiary** MD, PhD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
16. **Faramarz Esmail beigi** MD, Professor of Internal Medicine, School of Medicine, USA
17. **Ziba Farajzadegan** MD, Associate Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
18. **Hamid Fesharaki** Associate Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Marjane Foladi** PhD of Nursing, University of Florida, USA
20. **Aziz Gahari** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
21. **Ali Gheisari** MD, Professor of Cardiovascular Surgery, California, USA
22. **Jafar Golshahi** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
23. **Ali Mohammad Hanjani** MD, Professor of Cardiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
24. **Mina Hasanrezaei** MD, NeuroImmunology, School of Pharmacy, USA
25. **Saeid Morteza Heidari** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
26. **Mansour karamooz** MD, Professor of Urology, California, USA
27. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
28. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics & Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
29. **Majid Khazaei** MD, PhD, Associate Professor of Medical Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
30. **Parvin Mahzooni** MD, Associate Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
31. **Majid Maleki** MD, Professor of Cardiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
32. **Mohammad Mardani** MD, Associate Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
33. **Atiye Moghisi** MD, Professor of Endocrinology, Endocrine and Metabolism Research Center, USA
34. **Mehdi Modares** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
35. **Hoshang Moein** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
36. **Fereydoun Nouhi** MD, Professor of Cardiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
37. **Mohammadreza Nourbakhsh** Associate Professor of Physiotherapy, USA
38. **Farzin Pourfarzad** Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands
39. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
40. **Hassan Razmju** MD, Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
41. **Mohammad Reza Safavi** MD, Assistant Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
42. **Reza Rouzbahani** MD, MPH, Assistant Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
43. **Mansour Sholevar** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
44. **Masoud Soheilian** MD, Professor of Ophthalmology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran



## JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 32, No. 275, 4<sup>th</sup> Week, April 2014

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

Emerita Editor-in-Chief: **Roya Kelishadi MD**

Editor-in-Chief: **Majid Barekatin MD**

Associate Editor: **Reza Rouzbahani MD, MPH**

---

### Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

E-mail: [publications@mui.ac.ir](mailto:publications@mui.ac.ir)

### Office:

P.O. Box 81744-176, Isfahan, I.R. IRAN

Telefax: +98 311 7922291

E-mail: [jims@med.mui.ac.ir](mailto:jims@med.mui.ac.ir)

Website: <http://www.journals.mui.ac.ir/jims>

Office Secretary: Golnaz Rajabi

### Copy edit, Layout edit, Design and Print:

Farzanegan Radandish Co.

P.O. Box 81465-1798, Isfahan, I.R. IRAN

Telefax: +98 311 6686302

E-mail: [esfahanfarzanegan@yahoo.com](mailto:esfahanfarzanegan@yahoo.com)

[f.radandish@gmail.com](mailto:f.radandish@gmail.com)

[www.farzaneganco.ir](http://www.farzaneganco.ir)

Circulation: 500

---

### This journal is indexed in the following international indexes

- Scopus
- Chemical Abstracts
- Islamic World Science Citation Center (ISC)
- Academic Search Complete EBSCO Publishing databases
- WHO/EMRO/Index Medicus
- Google Scholar
- Index Copernicus
- Directory of Open Access Journal (DOAJ)
- Index Academicus
- Scientific Information Database ([www.sid.ir](http://www.sid.ir))
- [www.iranmedex.com](http://www.iranmedex.com)

---

The online version is available in; IUMS website ([www.journals.mui.ac.ir/jims](http://www.journals.mui.ac.ir/jims)), Iran Publications database ([www.magiran.com](http://www.magiran.com)), Scientific Information Database website ([www.sid.ir](http://www.sid.ir)) and in Health Researchers website ([www.iranmedex.com](http://www.iranmedex.com)).

Copyright: All rights reserved, no part may be reproduced without the prior permission of the publisher.