مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۴ شماره ۶ بهمن و اسفند ۱۳۹۱ صفحات ۳۷- ۳۴

شناسایی لژیونلا در سیستم آب بیمارستان های شهر تبریز

فاطمه یگانه سفیدان: مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
رضا قوطاسلو: مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:
Email: rzgottaslo@yahoo.com
محمد تقی اخی: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
محمد حسین سروش: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۱/۴/۱۷ پذیرش: ۹۱/۶/۱۴

چکیده

زمینه و اهداف: لژیونلا یکی از عوامل مهم بیماریزای تنفسی انسان می‌باشد. عفونت های لژیونلا منحصرا" از منابع محیطی آلوده و از طریق استنشاق آئروسل کسب می‌شود. سیستم های آبی ساختمان‌های بزرگ مانند بیمارستان‌ها اغلب با لژیونلا آلوده شده و خطر بالقوه‌ای برای بیماران محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی آلودگی سیستم آب بیمارستان‌های شهر تبریز توسط باکتری لژیونلا بود.

مواد و روش‌ها: ۱۴۰ نمونه آب، پس از جمع‌آوری از بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شدند. بلافاصله هر نمونه با استفاده از سیستم فیلتراسیون غشائی تغلیظ گردید. سپس در محیط Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) آگار طبق روش استاندارد کشت داده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۱۴۰ نمونه بررسی شده با استفاده از روش کشت ۸ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر لژیونلا مثبت تشخیص داده شد. تعداد نمونه‌های مثبت از آشپزخانه، حمام، سیستم گرمایش و سیستم ورودی ساختمان به ترتیب برابر۳، ۳، ۱ و ۱ بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که لژیونلا در آب شهری به ویژه در آب‌های گرم بیمارستان وجود داشته و به دلیل خطر بالقوه‌ی این باکتری، بهتر است تدابیر و اقدامات جدی در حذف این عامل عفونی انجام گیرد.

کلید واژه‌ها: بیمارستان، لژیونلا، سیستم آب

مقدمه

خانواده لژیونلاسه از یک جنس بنام لژیونلا، ۵۰ گونه و بیش از ۷۰ گروه سرولوژی تشکیل شده است (۱). شایعترین گونه بیماریزا لژیونلا پنوموفیلا بوده و ۹۰ درصد موارد گزارش شده از بیماری لژیونلوزیس در ایالات متحده مربوط به این گونه است (۳-۲). از طرفی ۶۰ درصد موارد گزارش شده، توسط لژیونلا پنوموفیلا گروه ۱ ایجاد می‌شود (۴). اعضای جنس لژیونلا باسیل گرم منفی باریک، پلی مورف، به ابعاد ۲ و ۰/۹-۰/۳ میکرومتر، هوازی و سخت رشد می‌باشند (۵ و۳). لژیونلا باکتری ساپروفیتی است که بطور طبیعی در دریاچه‌ها، رودخانه‌ها، سیستم‌های تهویه هوا و برج‌های سردکننده یافت می‌شود. نسبت به کلر و دماهای نسبتا" بالا مقاوم بوده و برای مدت زمان طولانی‌تری در این محیط‌ها زنده می‌ماند (۳). براساس مطالعات انجام یافته، لژیونلا تا ۱۴ ماه در آب زنده می‌ماند (۶). سیستم آب ساختمان‌های بزرگ مانند بیمارستان‌ها اغلب با لژیونلا آلوده شده و خطر بالقوه‌ای برای بیماران بستری دارد (۷). عفونت-های لژیونلا منحصرا" از منابع محیطی کسب شده و هیچ مخزن انسانی یا حیوانی گزارش نشده است (۶ و۵). انتقال از طریق استنشاق آئروسل منابع محیطی آلوده مانند سیستم‌های آب گرم و برج های سرد کننده اتفاق می‌افتد (۸ و۴). لژیونلا می‌تواند اکتسابی از جامعه یا بیمارستانی و به صورت اسپورادیک یا اپیدمیک رخ دهد (۹). بر اساس گزارشات ۸-۳ درصد پنومونی اکتسابی از جامعه (۱۰) و ۲۵ درصد پنومونی اکتسابی از بیمارستان‌ها بوسیله لژیونلا ایجاد می‌شود (۵). دلایل توجه به این باکتری در محیط بیمارستان متعدد بوده از جمله وجود افراد حساس و آسیب پذیر در بیمارستان-ها و میزان مرگ و میر بالا در میان افراد با ایمنی تضعیف شده می-باشد لذا هدف از این مطالعه شناسایی لژیونلا در سیستم آب بیمارستان‌های شهر تبریز بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی که در محدوده زمانی دی ماه سال ۱۳۹۰ تا فروردین ماه سال ۹۱ انجام یافته است از بخش‌های مختلف ۱۷ بیمارستان شهر تبریز به تعداد ۱۴۰ نمونه و بصورت تصادفی نمونه برداری شد و از نظر وجود لژیونلا مورد بررسی قرار گرفت. منابع نمونه‌برداری شامل سیستم ورودی ساختمان، سیستم گرمایش، دستگاه ونتیلاتور، بخش بستری، آب سردکن و آب‌های سرد و گرم آشپزخانه و دوش حمام بودند. نمونه ها در ظروف پلاستیکی استریل به حجم یک لیتر جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی تبریز منتقل گردید. جهت جدا کردن باکتری از آب، نمونه‌ها از سیستم فیلتراسیون غشائی از نوع غشاء نیتروسلولوز و به قطر ۰/۴۵ میکرومتر (Millipore, Ireland) عبور داده، سپس تغلیظ شدند. فیلترها در شرایط استریل از دستگاه فیلتراسیون جدا و در ظروف استریل حاوی 50ml آب همان نمونه قرار داده شدند. برای تهیه سوسپانسیون یکنواخت نمونه‌ها با استفاده از شیکر بمدت ۳۰ دقیقه تکان داده شدند. از هر نمونه تغلیظ شده 10ml برداشته و جهت حذف باکتری های مزاحم در مجاورت بافر اسیدی (HCL/KCL, pH=2/2)، به مدت ۵ دقیقه و حرارت ۵۶˚C به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. محیط کشت Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) طبق پروتکل شرکت سازنده (BD, USA) تهیه شد. از هر نمونه آب تغلیظ شده و تیمار یافته، 100µl برداشته و طبق روش استاندارد در دو پلیت BCYE (جهت کاهش احتمال نتیجه منفی کاذب) کشت داده و در دمای ۳۵˚C و شرایط دی اکسیدکربن ۵ درصد انکوبه شدند. رشد کلنی ها از روز سوم مورد بررسی قرار گرفت. کلنی‌های مشکوک، از نظر شکل، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی بررسی شدند. سپس برای تایید تشخیص در محیط کشت انتخابی BCYE Agar {حاوی مکمل رشد و آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین B (۸۰U/ml)، ونکومایسین (۰/۵ µg/ml)، سفامندول (۴ µg/ml)، آنیزومایسین (۸۰ µg/ml) } و محیط کشت معمولی آزمایشگاهی مانند بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند و مک کانکی کشت داده شدند. از آنجایی که لژیونلا قادر به رشد در محیط‌های معمولی نیست هر گونه رشدی در محیط‌های غیرانتخابی، آلودگی محسوب شده و از مطالعه حذف شدند. رشد در محیط انتخابی و عدم رشد در محیط‌های معمولی تائید کننده لژیونلا در نمونه مورد بررسی بود (۵ و ۱۱). در این مطالعه آزمایش‌های فنوتیپی برای تعیین هویت لژیونلا مورد استفاده قرار گرفت. کلر زنی و استفاده از ترکیبات کلر روش متداول در گندزدایی آب است که موجب حذف یا کاهش غلظت باکتری‌های آلوده‌کننده آب می‌شود. بنابراین در این مطالعه میزان کلر آب ها، در بررسی وجود یا عدم وجود لژیونلا مورد ارزیابی قرار گرفت. در محل نمونه‌گیری با استفاده از کیت آزمایش شیمیایی DPD (کاریزاب، ایران)، میزان کلر آزاد آب اندازه‌گیری شد. در این روش معرف DPD به آب مورد نظر اضافه و غلظت کلر بر اساس تغییر رنگ اندازه گیری شد. به این صورت که ابتدا ظرف نمونه با آب مورد نظر شستشو داده شد. سپس به ظرف نمونه ۵ قطره محلول شماره یک و ۲ قطره محلول شماره دو اضافه و تا خط نشانه از آب مورد آزمایش پر شد. بعد از ۳-۲ ثانیه رنگ نمونه با رنگ طیف استاندارد مقایسه و مقدار کلر آزاد ثبت گردید. میزان کلر آزاد آب شرب ۰/۸ – ۰/۲ میلی گرم در لیتر می‌باشد (۱۲). نتایج بدست آمده توسط روش آماری توصیفی (درصد و فراوانی) در نرم افزار SPSS مورد بررسی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه از مجموع ۱۴۰ نمونه آب جمع‌آوری شده از منابع مختلف ۱۷ بیمارستان شهر تبریز با استفاده از روش کشت، ۱۳۲ نمونه (۹۴/۳ درصد) از نظر وجود لژیونلا منفی و ۸ نمونه (۵/۷ درصد) مثبت تشخیص داده شد. بیشترین موارد مثبت مربوط به آب های گرم دوش حمام و آشپزخانه و کمترین موارد مربوط به آب های سرد دوش حمام و آشپزخانه، سیستم توزیع داخلی و سیستم گرمایش بود (جدول ۱). در کل از مجموع ۵۱ نمونه آب گرم جمع‌آوری شده از بیمارستان‌ها ۵ نمونه (۹/۸ درصد) و از ۸۹ نمونه آب سرد جمع‌آوری شده ۳ نمونه (۳/۴ درصد) از نظر لژیونلا مثبت بودند. میزان کلر آزاد آب‌ها در محل نمونه‌گیری با استفاده از کیت DPD به مقدار صفر تا یک میلی‌گرم در لیتر اندازه گیری شد. کمترین مقادیر کلر آزاد اندازه‌گیری شده در آب‌های گرم (۰ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و بیشترین مقدار در آب‌های سرد (۰/۳ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر) بود.

جدول ۱: توزیع فراوانی آلودگی آب بیمارستان های شهر تبریز به لژیونلا

منابع بیمارستان	تعداد منبع	تعداد منبع آلوده	درصد نسبت به منبع*	فراوانی کل (۵/۷٪)
سیستم ورودی ساختمان	۱۷	۱	۵/۹ درصد	۰/۷۱ درصد
سیستم گرمایش	۱۷	۱	۵/۹ درصد	۰/۷۱ درصد
دستگاه ونتیلاتور	۴	۰	۰	۰
بخش بستری	۱۷	۰	۰	۰
آب سرد کن	۱۷	۰	۰	۰
آب سرد آشپزخانه	۱۷	۱	۵/۹ درصد	۰/۷۱ درصد
آب گرم آشپزخانه	۱۷	۲	۱۱/۷۶ درصد	۱/۴۳ درصد
دوش سرد حمام	۱۷	۱	۵/۹ درصد	۰/۷۱ درصد
دوش گرم حمام	۱۷	۲	۱۱/۷۶ درصد	۱/۴۳ درصد

*درصد ها مشاهده شده، نسبت به منابع مختلف بیمارستان بوده که بطور جداگانه محاسبه شده است.

بحث

در این مطالعه از ۱۷ بیمارستان مورد مطالعه، ۷ بیمارستان و به میزان ۵/۷ درصد از نظر وجود لژیونلا آلوده بودند. علیرغم اینکه تمام بیمارستان‌ها از سیستم آبی تصفیه شده شهری استفاده می‌کنند اما در تعدادی از آنها لژیونلا مشاهده شد. طبیعی است که آب آشامیدنی در سیستم‌های توزیع استریل نیست. آب دارای میکروب‌هایی است که در فرایند تصفیه زنده مانده و یا از طریق شبکه لوله کشی وارد سیستم می‌شود. بسیاری از ارگانیسم‌های اتوتروف، هتروتروف و پاتوژن‌های فرصت‌طلب به دیواره لوله‌ها اتصال یافته، بیوفیلم تشکیل می‌دهند. لژیونلا در میان باکتری‌های فرصت طلب، بعنوان عامل تهدید کننده سلامت بشر، بویژه افرادی که از نظر سیستم ایمنی تضعیف یافته‌اند، محسوب می‌شود. این میکروارگانیسم‌ها تحت شرایطی وارد آب‌های جاری می‌شود (۱۳). لژیونلا جهت رشد و تکثیر نیازمند مواد مغذی است و این احتیاجات غذائی، پخش گسترده لژیونلا در محیط‌های آبی را رد می‌کند. این نیازها نشان دهنده داخل سلولی بودن باکتری است. لژیونلا بعنوان انگل اختیاری داخل سلولی پروتوزوآهای آزادزی مانند آمیب در آب و خاک مرطوب می‌باشد. پروتوزوآها بعنوان منبع بیماری لژیونر، باعث نگهداری و رشد داخل سلولی لژیونلا می‌شود. از طرفی بیوفیلم بعنوان پناهگاه و منبع تغذیه‌ای، بقاء و تکثیر لژیونلا در خارج از سلول های میزبان را فراهم می‌آورد. همانند بسیاری از باکتری‌های اختیاری داخل سلولی، لژیونلا در برخی از محیط‌ها تکثیر می‌یابد. بر اساس مطالعات انجام یافته، لژیونلا پنوموفیلا در فقدان آمیب در بیوفیلم قادر به تکثیر نیست ولی می‌تواند در حضور آمیب، در بیوفیلم و فاز پلانکتونی تکثیر یابد (۳). با توجه به ماهیت داخل سلولی لژیونلا و حضور در بیوفیلم، می‌تواند نسبت به شرایط نامساعد محیط مقاوم باشد. ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر از کلرآزاد، جهت از بین بردن لژیونلا در مخازن آبی کافی است. ولی تحت شرایطی این باکتری غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر را نیز تحمل می کند. این احتمال وجود دارد که لژیونلا قبل از تشکیل کیست در آمیب وارد شده و شرایط نامساعد محیط را تحمل می‌کند (۱). براساس مطالعه‌ای در ایتالیا که طی ده سال در زمینه اثرات روش‌های هیپرکلراسیون، شوک گرمایی، دی اکسیدکلراید، مونوکلرآمین، سیستم حرارتی و استفاده از فیلتر، در کنترل آلودگی سیستم توزیع آب گرم نسبت به لژیونلا انجام یافته، استفاده از دی اکسیدکلراید یا سیستم حرارتی الکتریکی توصیه شده است (۱۴). با توجه به اینکه مخزن لژیونلا آب بوده و نسبت به ضدعفونی کننده‌های معمول آب، بویژه کلر مقاوم است، تقریبا" در اکثر مخازن آبی یافت می‌شود. وجود این باکتری در تمام سیستم های آبی که امکان تشکیل آئروسل باشد، در افراد حساس می‌تواند مشکل آفرین باشد. این مسئله خصوصا" درآب‌های بیمارستان که افرادی با بیماری ریوی مزمن، افراد مسن و اشخاص با سیستم ایمنی تضعیف یافته بستری هستند، اهمیت بیشتری دارد.

از نتایج گزارش شده در زمینه جداسازی لژیونلا از سیستم آب بیمارستان در نقاط مختلف ایران، می‌توان به تهران با ۲۶/۵ درصد (۱۳/۳ درصد از چیلر، ۱۳/۳ درصد از کولر، ۱۶/۴ درصد از دوش آب گرم، ۳/۶ درصد دوش آب سرد)، اصفهان با ۳۶/۶ درصد (۴ مورد از آب گرم آشپزخانه، ۳ مورد از آب گرم حمام، ۳ مورد از سیستم توزیع، ۱ مورد از برجهای سرد کننده) و اهواز با ۶/۷ درصد (۱۹ درصد از یونیت دندانپزشکی و ۲/۹ درصد از شیر آب و دوش حمام) اشاره کرد (۱۱و۱۶–۱۵). همچنین در مطالعه‌ای که بر روی سیستم توزیع آب‌های آشامیدنی ورزشگاهی در ایتالیا انجام یافته، لژیونلا از ۲۹ درصد سیستم آب گرم جدا شده است (۱۳). درتحقیق انجام یافته بر روی مخازن آب ۶ بیمارستان در آمریکا ۵ بیمارستان از نظر لژیونلا آلوده بودند. همچنین ۲۹ مورد از این عوامل در انگلستان گزارش شده است (۱۵). اما در مقایسه با نتایج این تحقیق، میزان جداسازی لژیونلا بسیار نزدیک به نتایج گزارش شده از اهواز و کمتر از موارد گزارش شده از تهران و اصفهان می‌باشد. میزان آلودگی بالا در تهران و اصفهان می‌تواند حاکی از مقاومت باکتری نسبت به ضدعفونی کننده‌های مورد استفاده و یا عدم کفایت لازم کلر در ضدعفونی کردن آب ها باشد. با توجه به مطالعه کنونی و مطالعات انجام یافته بیشترین موارد گزارش شده، از آب های گرم بوده است و این بیانگر افزایش رشد لژیونلا در دماهای بالا نسبت به دماهای پایین می‌باشد. نظر به اینکه منبع آب گرم و آب سرد مصرفی در بیمارستان‌ها یکی بوده و کلرزنی در بیمارستان انجام نمی‌گیرد و با توجه به ماهیت فرار بودن گاز کلر، مشاهده بیشتر لژیونلا در آب‌های گرم نسبت به آب‌های سرد معقول بنظر می‌رسد.

روش کشت دارای حساسیت ۹۰–۸۰ درصد است (۵). در ایزولاسیون لژیونلا، معمولا" روش کشت، روشی استاندارد بوده و ترجیح داده می‌شود اما دارای محدودیت‌هایی چون سخت رشد بودن باکتری، نیاز به دوره انکوباسیون طولانی، آلودگی و رشد باکتری‌های دیگر و حضور لژیونلا های زنده غیرقابل کشت می‌باشد (۱۰).

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای اولین بار در شمال غرب کشور انجام شد و نشان داد که لژیونلا در سیستم آب شهری وجود دارد. بر اساس نتایج بدست آمده، روش‌های مرسوم تصفیه آب برای از بین بردن لژیونلا کافی نیست و در سازمان آب کشور بنظر نمی‌رسد که کشت و شناسایی این باکتری در آب شرب انجام گیرد. با توجه به اهمیت این باکتری به عنوان یک فاکتور عفونی در آب‌ها، لازم است از روش‌های ضدعفونی کننده بهتری استفاده شود. هر عاملی که موجب حذف فاکتورهای رشد لژیونلا مانند پروتوزوآها و بیوفیلم در سیستم آبی شود، باعث حذف لژیونلا در آب خواهد شد. لذا توصیه می‌شود سیستم لوله کشی در ساختمان‌های بزرگ بویژه در بیمارستان‌ها از نظر پوسیدگی که احتمال تشکیل بیوفیلم در آن بیشتر است، مورد توجه قرار گیرد. همچنین باید با بکارگیری بهترین روش ضدعفونی در کاهش هرچه بیشتر این عامل عفونی کوشش نمود. لذا با از بین بردن لژیونلا در محیط بیمارستان می‌توان از بیماری لژیونر اکتسابی از بیمارستان جلوگیری کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر اساس پایان نامه شماره ۸۹/۲-۶/۸ با حمایت مالی مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری انجام شد. بدین وسیله از همکاری آقایان دکتر سید مجتبی موسویان و دکتر سعید شجاع به جهت فراهم آوردن سویه استاندارد باکتری لژیونلا و دکتر محمدمهدی فیض آبادی و خانم دکتر سمیه یسلیانی فر به لحاظ راهنمایی‌های لازم در زمینه کشت باکتری تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Whelen AC. Legionella. In: *Diagnostic Microbiology*. 4th ed. Saunders Elsevier, 2011; PP: 415-421.
2. Reischl U, Linde HJ, Lehn N, Landt O, Barratt K, Wellinghausen N. Direct detection and differentiation of Legionella spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2002; **40**(10): 3814-3817.
3. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 years of Investigation. *Clinical Microbiologe Reviews* 2002; **15**(3): 506-526.
4. Joly P, Falconnet PA, André J, Weill N, Reyrolle M. Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**(4): 2801-2808.
5. Stout JE, Rihs JD, Yu VL. Legionella. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, ASM Press, 2007; PP: 809-823.
6. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Mosby Elsevier, 2007; PP: 424-429.
7. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**(9): 3985-3993.
8. Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**(5): 1452-1456.
9. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC. Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(7): 2618-2626.
10. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(5):1709-1712.
11. Mojtaba Mobariz A, Hosenidoust SR, Esmaeli D. [Identification of *Legionella* in hospital air condition and water networks]. *Tropical and Infectious Diseases Journal of Tehran* 1994; **12**(36): 33-37 (Persian).
12. McFeters G. *Drinking Water Microbiology*. New York, Springer Inc. 1990; PP: 261-268.
13. Bonadonna L, Briancesco R, Libera SD, Lacchetti I, Paradiso R, Semproni M. Microbial characterization of water and biofilms in drinking water distribution systems at sport facilities. *Cent Eur J Public Health* 2009; **17**(2): 99-102.
14. Marchesi I, Marchegiano P, Bargellini A, Cencetti S, Frezza G. Effectiveness of different methods to control Legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. *J Hosp Infect* 2011; **77**(1): 47-51.
15. Movahedian H, Shahmansouri MR, Neshat AA, Fazeli M. Identification of Legionella in the Hot Water Supply of a General Hospital in Isfahan. *Journal of Research in Medical Sciences* 2004; **6**: 289-293.
16. Khosroshahi N, Moosavian SM. [Isolation and identification of Legionnaire's disease agents from the medical equipments and environmental water sources]. *The Journal of Qazvin Univ of Med Sci* 2003; **29**: 70-74 (Persian).