

## بررسی میزان شیوع ژن بتالاکتاماز VEB1 در سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از ایزوله های بیمارستانی با مقاومت چندگانه

زینب گلشنی<sup>۱</sup>، ویدا داودی<sup>۱</sup>، علی شریف زاده<sup>۲</sup>

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان، ایران.  
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

یافته / دوره شانزدهم / شماره ۱ / بهار ۹۳ / مسلسل ۵۹

### چکیده

دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۱ ، پذیرش مقاله: ۹۳/۱۲/۳۰

\* مقدمه: بتالاکتامازها از آنزیم های تولید شده توسط پاتوژن های فرصت طلب و شایعی مانند سودوموناس آئروژینوزا هستند که کربایتم ها را مهار و قادر به هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتام ها هستند و به راحتی می توانند به سایر باکتری ها نیز منتقل شوند. بنابراین هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و شناسایی سویه های واجد ژن کدکننده بتالاکتاماز VEB1 در نمونه های بالینی در شهر اصفهان با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) است.

\* مواد و روش ها: سویه های سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های بالینی جمع آوری و آزمایش های استاندارد به منظور شناسایی سویه ها انجام شد. میزان مقاومت سویه ها به آنتی بیوتیک های مختلف بررسی و سپس از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای ردیابی ژن VEB1 استفاده شد.

\* یافته ها: بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین و سفوتاکسیم با ۶۵٪ و ۶۲٪ و کمترین مقاومت به آنتی بیوتیک های پپراسیلین (۴۸٪) و ایمپنم (۵۵٪) مقاومت مشاهده شد. تعداد ۳۸ سویه (۶۰٪) تولیدکننده ژن بتالاکتاماز VEB1 بودند.

\* بحث و نتیجه گیری: فراوانی سویه های تولیدکننده ژن بتالاکتاماز VEB1 در سویه های بیمارستانی روند روبه رشدی داشته است که این امر لزوم توجه بیشتر مراکز بهداشتی را در مورد تجویز دارو نشان می دهد. همچنین پیشنهاد می گردد فراوانی سویه های مولد بتالاکتاماز به منظور جلوگیری از انتشار این ژن ها، توسط روش های مولکولی و سریع بررسی گردد.

\* واژه های کلیدی: بتالاکتاماز، سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR).

آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان  
پست الکترونیک: sabzianz@yahoo.com

## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا از پاتوژن های فرصت طلب گرم منفی، غیر تخمیرکننده، اکسیداز مثبت و دارای شیوع بالا در عفونت های بیماران بستری با زخم های عفونی است. اغلب سویه های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک، قادر به تولید طیف وسیعی از آنزیم های بتالاکتامازی هستند. بتالاکتامازها به گروه های مختلفی تقسیم بندی می شوند، مانند بتالاکتاماز کلاس A، B و D آمبلر. بتالاکتاماز VEB1، از جمله بتالاکتامازهای وسیع الطیف و متعلق به گروه A طبقه بندی آمبلر است که در ارتباط با مقاومت دارویی و به فرم کاست ژنی و اینتگرون وجود دارد. این نوع بتالاکتاماز برای اولین بار در اشرشیا کلی جدا شده از بیماری در فرانسه گزارش شد (۱). این ژن اخیراً در سویه های سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه در کشورهایی از قبیل فرانسه، اسپانیا، ترکیه، کانادا، کره و تایلند گزارش شده است (۲). بتالاکتامازهای وسیع الطیف عموماً روی پلاسمیدهایی کددهی می شوند که باعث ایجاد مقاومت به سفالوسپورین هایی مانند سفوتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون می گردند (۳). سایر بتالاکتامازها مانند TEM و SHV در گذشته شناسایی شده اند (۴). این آنزیم ها به تناوب در سویه های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه گزارش شده اند. امروزه بیش از ۱۵۷ واریانت از آنزیم TEM، ۱۰۱ واریانت از SHV، ۶۵ واریانت از CTX-M، و ۵ واریانت از بتالاکتاماز VEB مورد شناسایی قرار گرفته اند (۵). بروز مقاومت در باکتری های حامل این ژن ها از چند طریق ایجاد می گردد: ۱- پمپ افلوکس ۲- تولید آنزیم های بتالاکتامازی ۳- تغییر در غشای خارجی (۶). بسیاری از سویه های سودوموناس آئروژینوزا قادرند چندین نوع از بتالاکتامازهای وسیع الطیف را تولید کنند، که آنها را قادر می سازد علیه آنتی بیوتیک های رایج مصرفی مقاوم باشند (۷)

بتالاکتامازها توسط مهارکننده های بتالاکتام مانند کلولانیک اسید مهار می شوند (۸-۱۱). از آنجایی که تاکنون مطالعات کمی در مورد شیوع این ژن در ایران صورت گرفته است بنابراین هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و شناسایی سویه های واجد ژن کدکننده بتالاکتاماز VEB1، در نمونه های بالینی در شهر اصفهان با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) است.

## مواد و روش ها

این مطالعه آزمایشگاهی روی ۱۰۰ ایزوله بالینی جمع آوری شده در بیمارستان های استان اصفهان از زمستان ۱۳۹۰ تا تابستان سال ۱۳۹۱ انجام شد. سویه ها از نمونه های مختلف مانند ادرار، برونش، خون، عفونت زخم، سواب از مخاط بینی و ... جمع آوری گردید. سپس نمونه ها به آزمایشگاه انتقال داده و آزمایش شدند. آزمایشات استاندارد شامل اکسیداز، تولید کلنی های بی رنگ روی مک کانکی آگار، تولید رنگ دانه سبزی روی مولر هینتون آگار، آزمون OF و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه بود. سپس برای انجام آزمایشات بعدی در محیط BHI برات حاوی گلیسرول ۱۸ درصد نگهداری شدند (۱۲،۱۳). برای بررسی مقاومت باکتری های جدا شده از روش استاندارد کربی-بوئر (دیسک دیفیوژن) استفاده گردید. پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت نیم مک فارلند، این سوسپانسیون به وسیله سواب استریل به محیط مولر هینتون آگار تلقیح گردید. سپس دیسک های آنتی بیوتیکی در روی محیط کشت با رعایت فاصله مناسب از یکدیگر قرار داده شدند و پلیت ها در ۳۷ درجه به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. قطر هاله فقدان رشد برای هر سویه اندازه گیری شد. دیسک های مورد استفاده شامل ایمی پنم، سفوتاکسیم، پیپراسیلین،

VEB1-F 5'GTGGAGTCCGATTAAGAGG3'  
VEB1-R 5'CATCATTAGTIGGCTGCTGC3'

### آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز : واکنش زنجیره ای

پلیمرز به منظور ردیابی ژن مورد نظر به شرح زیر انجام شد. بافر 1x واکنش زنجیره ای پلیمرز ۲/۵ μl، کلرید منیزیم ۰/۷ μl، الیگونوکلوئوتیدها ۲۰۰ μM، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر از DNA هدف، ۰/۲ Taq pol 1u و تا حجم نهایی ۲۵ μl آب مقطر انجام شد. برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد:

مرحله اولیه جداسازی دو رشته به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه، مرحله باز شدن دو رشته، در ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه، مرحله طولیل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ به مدت ۵ دقیقه. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از سویه سودوموناس آئروژینوزای حامل ژن VEB، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. ۴۰ میکرولیتر محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز به همراه ۴۰ میکرولیتر پرایمر ژن مربوط، به شرکت ژن فن آوران برای تعیین توالی ارسال شد تا از صحت عملکرد واکنش زنجیره ای پلیمرز یقین حاصل شود (۱۲).

محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید به مدت یک ساعت در ولتاژ ثابت ۸۰ الکتروفورز شد و سپس محصولات توسط ترانس لومیناتور بررسی گردیدند (۱۱-۱۳).

### یافته‌ها

تعداد ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های بالینی بیماران بستری جمع آوری شد. بیشترین نمونه های به دست آمده از ادار و سپس برونش بودند. بیشترین مقاومت سویه ها به آنتی بیوتیک آمیکاسین با ۶۵٪ و کمترین آن به پیپراسیلین با ۴۸٪ مقاومت مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). میزان مقاومت سویه‌ها به

سفتریاکسون، سفزازیدیم، توبرامایسین، آمیکاسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین بودند (۱۲-۱۰). از سویه سودوموناس آئروژینوزا ۱۴۳۰ PTCC به عنوان سویه شاهد استفاده شد.

### استخراج DNA سویه ها: برای استخراج DNA از

روش فنل کلروفرم استفاده گردید. به طور خلاصه، ابتدا سوسپانسیون از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI broth تهیه شد. ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری در میکروتیوب ریخته و در سانتریفوژ دور ۱۳۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه رسوب گیری و محلول رویی دور ریخته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز حاوی ۱۰٪ SDS، پروتئیناز K، ۵ NaCl مولار، EDTA ۰/۵ مولار و Tris-Hcl ۱۰۰ میلی مولار به آن افزوده و محتویات میکروتیوب با ورتکس مخلوط شد. سپس ویال ها به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۵۵ درجه قرار گرفتند. فنل کلروفرم و ایزوآمیل الکل به ویال ها افزوده، حدود ۶-۵ ثانیه ورتکس و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی که حاوی DNA است به ویال جدید منتقل و هم حجم آن، اتانل سرد اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، ویال ها به ۲۰- منتقل شد. پس از یک ساعت، ویال ها از ۲۰- در آورده و در دور ۱۰۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی خارج و ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ به رسوب ها اضافه و در دور ۱۰۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته و ویال ها به صورت وارونه در جایی قرار داده تا الکل آن تبخیر شود. در نهایت به هر ویال ۵۰ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد و آنها در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند (۱۳).

سپس پرایمر اختصاصی مربوط به ژن blaVEB1

طراحی و برای سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در زیر آمده است:

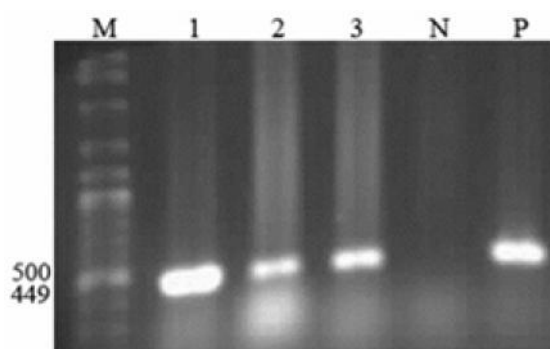
بستری باشد. بنابراین بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های بیمارستانی دید روشنی از چالش های موجود در اختیار ما قرار می دهد (۱۱،۱۳). تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها نشان داد که مقاومت آنها به کربانم ها رو به افزایش است.

در این مطالعه با بررسی روی ۱۰۰ ایزوله بالینی، مقاومت نسبت به سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین و ایمپنم در کل ۵۷٪، ۵۶٪ و ۵۵٪ بود. در مطالعه جمالی و همکاران در سال ۱۳۸۷، ۱۸۶ بیمار سوختگی بررسی شدند که ۷۲٪ مرد و ۲۸٪ زن بودند. در این مطالعه بیشترین مقاومت به سفنزوکسیم و سفوتاکسیم با مقاومت ۱۰۰٪ و کمترین مقاومت به ایمپنم با ۶۱٪ مشاهده گردید (۱۳). در حالی که در مطالعه حاضر کمترین مقاومت نسبت به پیپراسیلین (۴۸٪) گزارش شد. این اختلاف شاید بیانگر حساسیت بیشتر باکتری های جدا شده از بیماران سوختگی نسبت به ایمپنم در مقایسه با سایر باکتری ها باشد. همچنین جمالی و همکاران میزان مقاومت به سفنازیدیم را ۹۱٪، آمیکاسین را ۷۳٪، پیپراسیلین را ۷۵٪ و سیپروفلوکساسین را ۶۸٪ گزارش دادند. این نتایج حاکی از شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران سوختگی نسبت به سایر بیماران بستری است.

فاضلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ با بررسی روی ۱۱۱ بیمار سوختگی در بیمارستان امام موسی کاظم (ع) اصفهان، گزارش دادند تمامی سویه ها به سفنازیدیم و تیکارسیلین و بیش از ۹۴٪ به ایمپنم، سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین مقاوم بودند (۱۴). میرصالحیان و همکاران در مطالعه ای در سال ۱۳۸۹ با بررسی روی ۱۷۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از سوختگی، میزان مقاومت به ایمپنم را ۵۲٪، آمیکاسین را ۸۱٪ و تیکارسیلین را ۸۴٪ گزارش دادند (۱۸). این میزان بالای مقاومت در مطالعات میرصالحیان و فاضلی نشان دهنده شیوع بیشتر ژن های مقاومت در سویه های سوختگی نسبت به سایر نمونه های بالینی است (۱۴،۱۶).

آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین ۵۶٪، جنتامایسین ۵۹٪، توبرامایسین ۶۱٪، آمیکاسین ۶۵٪، ایمپنم ۵۵٪، سفپیم ۵۵٪، سفنازیدیم ۵۷٪، سفتریاکسون ۶۰٪، سفوتاکسیم ۶۲٪ و پیپراسیلین ۴۸٪ بود.

همچنین در این مطالعه تمامی سویه ها از لحاظ ژنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور، تمامی سویه های مقاوم به چند آنتی بیوتیک (ایمپنم، سفنازیدیم، پیپراسیلین و ...) از لحاظ وجود ژن بتالاکتاماز VEB1 با تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز بررسی شدند. از ۶۳ باکتری مقاوم به چندین آنتی بیوتیک که روی همه آنها تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام گرفت، ۳۸ سویه (۶۰٪) حامل این ژن بودند (شکل ۱).



شکل ۱. M. ۱۰۰bp مارکر، N کنترل منفی، P کنترل مثبت، ۱، ۲ و ۳ سویه های حامل ژن bla VEB1 ۴۴۹ bp هستند.

## بحث و نتیجه گیری

شناسایی سویه های مقاوم به چند آنتی بیوتیک در بیمارستان های مختلف، به منظور جلوگیری از انتشار ژن های مقاومت امری ضروری به نظر می رسد (۱۴). امروزه با شیوع باکتری های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک، کنترل عفونت های بیمارستانی اغلب به شکست و مرگ بیماران منجر می شود (۱۵). این امر ممکن است ناشی از فقدان اطلاعات کافی در مورد فلور غالب بیمارستانی و ناشناخته ماندن منشأ مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران

به سایر مطالعات، نشانگر افزایش مصرف آنتی بیوتیک و متعاقب آن، افزایش انتقال ژن های مقاومت و در نتیجه، شیوع بیشتر ژن های مورد بحث در سال های اخیر نسبت به گذشته است. این امر بر لزوم بیشتر توجه به تجویز صحیح دارو در مراکز درمانی تاکید می کند. بنابراین پیشنهاد می گردد در سایر بیمارستان ها نیز با توجه به شیوع بالای این ژن (در اصفهان و کرمان) بررسی و تحقیق گردد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان انجام شد. از مسئولین و کارکنان محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و هم چنین سرکار خانم دکتر رنجبر تشکر و قدردانی می گردد.

در بررسی شاه چراغی و همکاران در سال ۲۰۱۰ که شیوع ژن های بتالاکتامازی را بررسی کرده بودند، از میان ۴۱ سویه جدا شده از مراکز سوختگی کرمان، فراوانی ژن bla OXA10 در ۹۲٪ و فراوانی ژن bla VEB1 در ۱۰۰٪ سویه ها به روش RFLP-PCR تأیید شد. هم چنین در این مطالعه فراوانی ژن CTX-M در ۲٪، PER-1 در ۶۸٪، GES-1 در ۲۴٪ و OXA-1 در ۷۰٪ سویه ها مشاهده شد (۱۲).

همان گونه که ملاحظه می گردد، فراوانی ژن VEB1 در مطالعه شاه چراغی، از مطالعه حاضر بیشتر بوده است. در مطالعه ای که چانویت و همکاران در ۲۰۰۷ روی کلبسیلا پنومونیه انجام دادند، شیوع VEB1 را در ۱۱ (۳۷٪) ایزوله گزارش دادند (۱۵). برت و همکاران در سال ۲۰۰۲ فراوانی ژن bla OXA10 را در ۲۶٪ از سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های بالینی گزارش دادند (۱۷).

در مطالعه دیگری جیانگ و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی سویه های جدا سازی شده، فراوانی ژن های bla VEB3، bla OXA10 و bla TEM-1 را به ترتیب در ۲۹، ۱۲ و ۱۳ ایزوله از میان ۷۵ ایزوله سودوموناس جدا سازی شده گزارش دادند (۱۸). بنابراین می توان گفت فراوانی ژن bla VEB در ایران شیوع بالاتری دارد. بالاتر بودن فراوانی ژن های بتالاکتاماز در تحقیقات ایران نسبت

## References

1. poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi B, Labia R. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:573-581.
2. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 1995; 4:593-600.
3. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42:128-131.
4. Bradford PA. Extended-spectrum - lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;48:933-951.
5. Poole K. Resistance to -lactam ,Antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61: 2200-2223.
6. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert .Rev Anti Infect Ther.* 2010; 1:71-93.
7. Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest.* 2001; 2:S397-404.
8. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23: 160-201.
9. Yu WL, Chuang YC, Rasmussen JW. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006; 39:264-277.
10. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemothe.* 2008;61(4):827-830.
11. Tan J, Pitout JD, Guttman DS. New and sensitive assay for determining Pseudomonas aeruginosa metallo-beta-lactamase resistance to imipenem. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1870-1872.
12. Shacheraghi F, Shakibaie MR, Noveiri H. Molecular Identification of ESBL Genes blaGES-1, blaVEB-1, blaCTX-M blaOXA-1, blaOXA-4, blaOXA-10 and blaPER-1 in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Burn Patients by PCRRFLP and Sequencing Techniques. *Int J Bio and Sci.* 2010;6:3138-3142. (In Persian)
13. Jamali SH, Bahar MA, Hoshmand M. Prevalence of VIM & IMP metallo-beta-lactamase in imipenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. *Knowledge microbial.* 2009;(1) :19-25. (In Persian)
14. Fazeli H, Moslehi z, Irajian gh, Salehi m. Pattern of drug resistance and beta-lactamase genes VIM in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized

- patients, accidental burns. *J Med Microbiol.* 2009;3(4):1-8. (In Persian)
15. Chanwit Tribuddharat MD, Somporn S, Wararat C. A Correlation between Phenotypes and Genotypes of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents.* 2007; 24 (3):117-123.
16. Mirsalehian A, Feyzabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jabal Ameli F. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *T U Med J (TUMJ).* 2008;66(5):333-337. (In Persian)
17. Bert F, Branger C, Zechovsky NL. Identification of PSE and OXA - lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Antimicrob Chemother.* 2002; 50:11-18.
18. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F. Detection of Extended-Spectrum b - Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):2990-2995.