مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۲۹-۳۴

تشخیص سریع *پسودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های بالینی بیماران مبتلا به سوختگی از طریق روش هیبریدیزاسیون در موضع توسط پروب های فلوئورسنت(FISH)

فرشته بدیع*، سید مجتبی موسویان

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
نویسنده رابط: فرشته بدیع، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تلفن: ۰۹۱۶۶۱۲۹۳۲۳ f_b_1977@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۷/۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۲۲

چکیده

زمینه و اهداف: *پسودوموناس آئروژینوزا* یکی از مهم ترین پاتوژن های فرصت طلب در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی از جمله بیماران مبتلا به سوختگی است. عفونت زخم ناشی از *پسودوموناس آئروژینوزا* در این بیماران سریعاً می تواند منجر به عفونت سیستمیک شود و جان بیماران را به مخاطره بیندازد. هدف این مطالعه، شناسایی سریع *پسودوموناس آئروژینوزا* در بیماران سوخته با استفاده از روش FISH است.

روش بررسی: این مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه خون و زخم بیماران مبتلا به سوختگی بستری در بیمارستان طالقانی اهواز انجام شد. پس از انجام کشت و تست های تشخیصی تکمیلی روی نمونه ها و تشخیص پسودوموناس در آنها، نمونه ها تحت تاثیر پروب های مکمل نواحی خاصی از RNA ریبوزومی ارگانیسم قرار گرفتند و چون پروب ها، توسط رنگ های فلورسنت نشاندار شده بودند، پس از هیبریدشدن و اتصال پروب به ارگانیسم، درخشش فلورسنت حاصل در زیر میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده بود.

یافته ها: از میان ۴۲ نمونه خون، ۱۳ مورد *پسودوموناس آئروژینوزا* از طریق کشت جداسازی شد که FISH توانست تمام آنها را شناسایی کند. تنها ۱ مورد دارای کشت مثبت پسودوموناس بود ولی FISH نتوانست آن را تشخیص دهد. حساسیت و ویژگی FISH برای تشخیص *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۹۴/۷٪ و ۱۰۰٪ بدست آمد. در بین نمونه های زخم، ۲۰ موردکشت مثبت پسودوموناس حاصل گردید که FISH تمامی آنها را تشخیص داد. حساسیت و ویژگی FISH بترتیب ۱۰۰٪ و ۹۳/۳٪ بدست آمد.

نتیجه گیری: بررسی نتایج بدست آمده نشان می دهد که FISH یک روش دقیق و سریع برای شناسایی عامل عفونت در زمانی است که تشخیص سریع بسیار اهمیت دارد و می تواند منجر به نجات جان بیمار شود. لازم به ذکر است که تمام مراحل FISH حداکثر به ۳ ساعت زمان نیاز دارد و از طرفی به علت اینکه در روش FISH مورفولوژی ارگانیسم قابل رویت است، شناسایی عامل عفونت با اطمینان انجام می شود.

کلید واژه ها: FISH، *پسودوموناس آئروژینوزا*، فلوئورسنت، پروب

مقدمه:

پسودوموناس ها از جمله مهم ترین عوامل بیماریزا در بیمارانی هستند که سیستم دفاعی آنها ضعیف شده است. این ارگانیسم ها به عنوان پاتوژن های فرصت طلب می توانند در بیماران ذکر شده، عفونت های شدیدی بوجود آورند و حتی منجر به مرگ شوند(۱). در این میان، بیشترین عفونت ها مربوط به زخم های سوختگی هستند (۲و۳). به دنبال کلونیزه شدن زخم سوخته با ارگانیسم، تخریب عروق موضعی، نکروز بافتی و نهایتاً سپتی سمی در این بیماران امری شایع است. در بیمارانی که مبتلا به سپتی سمی می شوند، میزان مرگ و میر بالا است و در مواردی که بیمار دچار نقص سیستم ایمنی نیز باشد، این میزان به ۸۰٪ می رسد (۲). بنابر آنچه گفته شد، تشخیص سریع عامل عفونت، ضروری به نظر می رسد. *پسودوموناس آئروژینوزا*، یکی از عوامل ایجاد کننده سپتی سمی در بیماران مبتلا به سوختگی است که شناسایی آن با روش های مرسوم به ۲ تا ۳ روز زمان نیاز دارد که این زمان برای بیمار دچار سپتی سمی، طولانی است. امروزه محققین با استفاده از روش های مولکولار به شناسایی دقیق عوامل بیماریزا می پردازند. یکی از جدیدترین روش های مورد استفاده، هیبریدیزاسیون در موضع با استفاده از پروب های نشاندار شده توسط مواد فلوئورسنت (FISH) است که در آن از پروب های اولیگونوکلئوتیدی نشاندار شده با رنگ های فلوئورسنت استفاده می شود. این پروب ها به توالی های مکمل خود روی RNA ریبوزومی متصل شده و اصطلاحاً هیبرید می شوند (۴و۵). یکی از مزایای این تکنیک نسبت به سایر روش های مولکولی این است که در این روش، مورفولوژی میکروب ها به خوبی قابل رویت است(۶)، در ضمن سرعت بیشتری نسبت بهPCR دارد (۷) و نیازی به تکثیر DNA و استخراج آن از باکتری نمی باشد (۸). در این مطالعه از روش FISH برای تشخیص سریع و اختصاصی *پسودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های کشت خون و سوآب های زخم بیماران استفاده شده است.

مواد و روش ها:

الف) کشت و فیکساسیون سویه های استاندارد:

سویه های استاندارد شامل *پسودوموناس آئروژینوزا* *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25833) به عنوان کنترل مثبت و اشریشیاکلی *Escherishia coli* (ATCC 25922) به عنوان کنترل منفی بودند. این سویه ها در محیط مایع لوریا برتانی (LB) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه شدند تا به مرحله رشد لگاریتمی برسند. سپس سوسپانسیون میکروبی بدست آمده در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی حاصل با PBS شستشو و مجدداً سوسپانسیون تهیه گردید و با پارافرمآلدئید۴٪ سرد(۴) و با حجمی معادل ۳ برابر حجم سوسپانسیون، مخلوط گردید. سویه هایی که به این ترتیب فیکس شدند در منهای۲۰ درجه سانتیگراد ذخیره گردیدند.

ب)آماده سازی نمونه های خون:

در این مطالعه نمونه های کشت خون مثبت بیماران از آزمایشگاه بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی جمع آوری شدند. از ۴۲ نمونه بطری کشت خون با استفاده از سرنگ و نیدل استریل، نمونه گیری به عمل آمد، سپس رنگ آمیزی گرم روی اسمیرهای تهیه شده انجام گرفت و در صورت مشاهده باسیل گرم منفی، ضمن اینکه نمونه ها روی محیط های نوترینت آگار، مک کانکی آگار و ستریمیدآگار (۴) کشت داده شدند، جهت انجام FISH (Fluorescent in situhybridization) ، نیز ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۹۰۰ میکرولیتر پارافرمآلدئید ۴ ٪ سرد ، مخلوط و فیکس گردید. کلنی های مشکوک بدست آمده از محیط کشت جامد با رنگ آمیزی گرم، تست های اکسیداز، OF و لوله های تشخیصی مورد شناسایی قرار گرفتند.

ج)آماده سازی نمونه های زخم:

در این پروژه، ۵۸ نمونه سوآپ زخم گرفته شده از بیماران مورد مطالعه قرار گرفت. از ترشحات زخم هر بیمار مبتلا به سوختگی در بیمارستان طالقانی اهواز، با ۲ سوآپ استریل، نمونه برداری انجام و پس از قرار دادن هر سوآپ درون یک لوله استریل، نمونه ها به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی منتقل گردید. یک سوآپ برای کشت روی محیط های نوترینت آگار، مک کانکی و ستریمید آگار استفاده شد و سوآپ دوم جهت انجام FISH در ۳۰۰ میکرولیتر PBS استریل چرخانیده شد تا مواد جذب شده آن به مایع منتقل گردد، سپس ۹۰۰ میکرولیتر پارافرمآلدئید ۴٪ سرد به آن افزوده و فیکس گردید. کلنی های مشکوک به پسودوموناس حاصل از محیط های جامد نیز با رنگ آمیزی گرم، تست های اکسیداز،OF و لوله های تشخیصی شناسایی شدند.

د)FISH:

جهت انجام FISH بر روی سویه های استاندارد و نمونه ها، از لام های ۱۰ حفره ای(BioGene) استفاده شد. برای هر نمونه دو حفره از یک لام در نظر گرفته شد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه فیکس

شده در هر یک از دو حفره ریخته شد. پس از خشک شدن نمونه ها در هوا، لام ها به منظورآب گیری در رقت های متوالی الکل ۵۰٪، ۸۰٪ و اتانل مطلق (هر کدام ۳ دقیقه) قرار گرفتند(۷). پس از آن هر حفره توسط ۱۰ میکرولیتر بافر هیبریدیزاسیون (Tris-HCl ۲۰ میلی مولار، NaCl ۰/۹ مولار، فرمامید۳۰٪ و SDS ۰/۰۱ ٪) حاوی پروب با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر پوشانده شد. هر لام در یک لوله فالکون مرطوب، در دمای ۴۶ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شد تا عمل هیبریدیزاسیون پروب با نمونه صورت پذیرد (۹). لازم به ذکر است که دو پروب EUB-FITC وPseaerA -CY3 به صورت مخلوط در یک حفره و پروب Ppu-FITC (جدول۱)، در حفره دیگر ریخته شد تا هر نمونه تحت تاثیر ۳ پروب قرار گیرد. پس از اتمام زمان هیبریدیزاسیون، لام ها با بافر شستشو (Tris-HCl ۲۰ میلی مولار، NaCl۱۱۲ میلی مولار و SDS ۰/۰۱ ٪)، در دمای ۴۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه شستشو شدند. در مرحله بعد لام ها توسط رنگ DAPI با غلظت ۱ میکروگرم در میلی لیتربه مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند(۹). این رنگ به صورت غیر اختصاصی DNA را رنگ می کند. در مرحله نهایی، لام ها با PBS شستشو و خشک شدند و با ماده مونتینگ پوشانده شدند تا با میکروسکوپ اپی فلورسنت دارای فیلتر های مختلف بررسی گردند.

ه) چگونگی بررسی و تفسیر لام ها:

برای هر نمونه از جمله نمونه های استاندارد ۲ حفره در نظر گرفته شد که در حفره اول پروب سبز رنگ مخصوص شناسایی جنس پسودوموناس و در حفره دوم مخلوط دو پروب سبز رنگ EUB و پروب قرمز رنگ *پسودوموناس آئروژینوزا* مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت هرحفره با ۴ فیلتر مختلف آبی، قرمز، سبز و زرد در زیر میکروسکوپ اپی فلورسنت بررسی شد. اگر در نمونه مورد بررسی *پسودوموناس آئروژینوزا* وجود داشت، می توانست به هر ۳ پروب فوق متصل (هیبرید) شود، بنابراین با پروب پسودوموناس درخشش سبز و با مخلوط ۲ پروب EUB و *پسودوموناس آئروژینوزا*، در فیلتر سبز به صورت باسیل های سبز و در فیلتر قرمز با درخشندگی قرمز ظاهر می شد. همین حفره با فیلتر مخلوط به رنگ زرد مشاهده می گردید که حاصل ترکیب رنگ سبز و قرمز در حفره ای است که از مخلوط پروب ها استفاده می شد. اگر ارگانیسم مورد نظر ما با استفاده از کشت، پسودوموناس تشخیص داده شده بود، می توانست با پروب پسودوموناس هیبرید شود و نور سبز (مربوط به FITC) را ساطع کند. در حفره مخلوط (حفره دوم لام) هم درخشندگی سبز پروب EUB را با فیلتر سبز نشان می داد ولی نمی توانست فلورسانس قرمز (مربوط به CY3 ویژه گونه آئروژینوزا) را از خود بروز دهد. برای سایر باکتری ها همچون اشریشیا کلی(کنترل منفی)، که همگی قابلیت هیبرید شدن با پروب EUB را داشتند، فقط درخشش سبز رنگ پروب EUB مورد انتظار بود ولی چون با پروب های پسودوموناس هیبرید نمی شدند، فلورسنس مربوط به این پروب ها را نیز نشان نمی دادند. رنگ DAPI نیز با DNA تمام ارگانیسم ها واکنش نشان می داد و همه باکتری ها با فیلتر مخصوص، به رنگ آبی مشاهده می شدند.

یافته ها:

نتایج بررسی نمونه های خون:

از بین ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان سوانح سوختگی طالقانی، ۴۲ نمونه کشت خون مثبت مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج تلقیح آنها برروی محیط جامد منتهی به جداسازی ۱۹ ایزوله پسودوموناس (آئروژینوزا و غیر آئروژینوزا) گردید. آزمایش FISH توانست ۱۸ ایزوله پسودوموناس را بصورت اختصاصی (جدول۲)، شناسایی کند و تنها ۱ مورد دارای کشت مثبت سودوموناس بود که FISH نتوانست آن را شناسایی کند. حاصل تلقیح ۲۳ نمونه کشت خون باقیمانده بر روی محیط جامد، جداسازی۲۱ ارگانیسم باسیلی شکل بود که پس از تعیین هویت آنها از طریق تست های بیوشیمیایی، یکی از باسیل های اشریشیاکلی، اسینتوباکتر و یا انتروباکتر مورد شناسایی قرار گرفتند. این باکتری ها در آزمایش FISH فقط درخشش سبز رنگ مربوط به پروب EUB را از خود نشان دادند. از میان ایزوله های پسودوموناس، ۱۳ مورد با FISH به صورت اختصاصی، *پسودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شدند که نشان دهنده هیبرید شدن آنها با پروب ویژه گونه آئروژینوزا بود.

نتایج بررسی نمونه های زخم:

از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده، ۵۸ نمونه سوآپ از ترشحات زخم بیماران بستری در بیمارستان طالقانی مورد آزمایش قرار گرفت. تلقیح سوآپ های زخم به محیط های کشت جامد، منتهی به جداسازی ۲۰ ایزوله پسودوموناس گردید که همین نتایج از طریق آزمایش FISH بر روی نمونه ها نیز حاصل گردید، ضمن آنکه گونه این ایزوله ها از طریق FISH آئروژینوزا تشخیص داده شد. تلقیح ۲۸ نمونه دیگر به محیط های کشت جامد، منتهی به جداسازی ارگانیسم هایی گردید که پس از تعیین هویت آنها توسط

تست های بیوشمیایی، ایزوله های اشریشیا کلی، انتروباکتر، سراشیا، اسینتوباکتر و نیز کوکس های گرم مثبت مورد شناسایی قرار گرفتند. این ایزوله ها نیز در آزمایش FISH، فقط درخشش مربوط به پروب EUB را از خود نشان دادند (جدول۲). کشت ۲ نمونه منفی بود ولی FISH توانست *پسودوموناس آئروژینوزا* را در آنها شناسایی کند.

جدول۱: پروب های اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده برای تشخیص پسودوموناس ها

پروب	میکروارگانیسم هدف	سکانس پروب (5'-3')	جایگاه هدف (target site)
Eub338	یوباکتری ها	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S rRNA
Ppu	جنس پسودوموناس	GCT GGC CTA ACC TTC	23S rRNA
PseaerA	*پسودوموناس آئروژینوزا*	TCT CGG CCT TGA AAC CCC	23S rRNA

جدول۲: نتایج جداسازی باکتری ها از نمونه های خون و زخم به روش کشت وFISH

نوع نمونه	کشت					FISH				
	پسودوموناس آئروژینوزا	پسودوموناس غیرآئروژینوزا	باکتری های دیگر	منفی	جمع	*پسودوموناس آئروژینوزا*	پسودوموناس غیرآئروژینوزا	باکتری های دیگر	منفی	جمع
خون	۱۳	۶	۲۲	۱	۴۲	۱۳	۵	۲۲	۱	۴۲
زخم	۲۰	۰	۲۸	۱۰	۵۸	۲۲	۰	۲۸	۸	۵۸
جمع	۳۳	۶	۵۰	۱۱	۱۰۰	۳۵	۵	۵۰	۱۰	۱۰۰

بحث:

پسودوموناس آئروژینوزا یک عامل مهم در مرگ و میر مبتلایان به لوسمی یا لنفوم، سوختگی های شدید و بیماران دچار فیبروز کیستیک می باشد. هر چند تشخیص *پسودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از چند تست ساده در آزمایشگاه امکان پذیر است ولی گاهی کلونیزه شدن زخم سوخته با پسودوموناس از یک سو و فقدان پاسخ نوتروفیلیک مناسب به تهاجم بافتی، بیمار را به فاز باکتریمی و سپسیس می برد و سریعاً منجر به مرگ می شود. بنابراین لزوم دستیابی به روش هایی که بتوانند در مدت زمان کوتاهی ارگانیسم را برای ما شناسایی کنند، بسیار محسوس است. در طی سال های اخیر، تکنیک های مولکولی مانند PCR ، بطور موفقیت آمیزی برای شناسایی باکتری های کند رشد مانند مایکوباکتریوم ها و یا میکروارگانیسم هایی که کشت دادن آنها مشکل است، نظیر تروفریما ویپلی مورد استفاده قرار گرفته اند ولی روش هایی مانند PCR، اطلاعاتی در مورد مورفولوژی، تعداد، توزیع فضایی و یا محیط سلولی ارگانیسم ها نشان نمی دهند. در مقابل تکنیک هیبریدیزاسیون در موضع با استفاده از پروب های فلورسنت (FISH)، دقت روش های مولکولی را با اطلاعات بدست آمده از میکروسکوپ برای شناسایی سلول های میکروبی در محیط زیست خود یا بافت بیمار ترکیب می کند(۱۰). در این تحقیق، از میان ۴۲ نمونه خون، ۱۹ مورد کشت مثبت پسودوموناس را نشان دادند که FISH توانست ۱۸ مورد را به درستی شناسایی کند علت با وجود کشت مثبت نمونه، منفی بودن یکی از نمونه ها، می تواند مربوط به کم بودن تعداد باکتری در بطری کشت خون اولیه باشد، به همین علت FISH نتوانست باسیل را شناسایی کند. در یک مطالعه مشابه، Jansen و همکاران (۱۱)، گزارش دادند که تعداد اندک باکتری در نمونه می تواند عاملی برای منفی شدن تست FISH ، علیرغم مثبت بودن نتیجه کشت گردد. از طرف دیگر اتوفلوئورسانس زمینه[1] نیز می تواند مانعی برای مشاهده باکتری اصلی باشد. بافت های حاوی کلاژن، الاستین و سلول های خونی همچون اریتروسیت و ائوزینوفیل، دارای پرتوهای فلوئورسانس هستند که با فلوئورسانس حاصل از باکتری اصلی تداخل کرده و مانع مشاهده آن می گردند (۷و۱۲). Hogardt نیز در مطالعه خود به این نکته اشاره کرده است (۴). علاوه برموارد ذکرشده، محتوای اندک RNA ریبوزومی نیز می تواند عاملی برای منفی شدن کاذب نتایج شود. اگر چه مقدار RNA ریبوزومی سلول های باکتریایی در میان گونه های مختلف اختلاف قابل توجهی ندارد، ولی این مقدار میان سلول های یک سویه بر اساس وضعیت فیزیولوژیک آنها متفاوت است.

بطوریکه فعالیت فیزیولوژیک پائین می تواند منجر به ضعیف بودن سیگنال های حاصل در FISH و در نتیجه پاسخ منفی کاذب گردد(۵و۱۳). حساسیت FISH برای شناسایی *پسودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های خون ۹۵٪ و ویژگی آن ۱۰۰٪ به دست آمد. در یک مطالعه مشابه Kempf و همکاران حساسیت FISH را ۱۰۰٪ و ویژگی آن را نیز ۱۰۰٪ به دست آوردند(۷). Jansen و همکاران نیز حساسیت و ویژگی FISH را ۱۰۰٪ ارزیابی کردند(۱۱). در میان۵۸ نمونه زخم، ۲۰ نمونه از طریق کشت واجد پسودوموناس بودند که FISH توانست تمام آنها را شناسایی کند. در ضمن ۲ نمونه هم که دارای کشت منفی بودند، از طریق FISH، مثبت ارزیابی شدند. منفی شدن کشت ۲ نمونه زخم احتمالاً می تواند به علت اختلال در رشد ارگانیسم باشد. وجود پمادهای آنتی بیوتیک برروی سطح سوختگی در هنگام نمونه گیری، یک عامل محدود کننده در جداسازی باکتری از طریق کشت به شمار می آید. در تحقیقات جداگانه ای که Russmann وKempf انجام داده اند، نشان داده شده است که این عامل در پاسخ FISH تاثیر قابل توجهی نداشته و این تکنیک قادر است RNA ریبوزومی باکتری را علی رغم غیر قابل کشت بودن آن، هیبرید و شناسایی نماید (۷و۸). احتمال دیگری که برای منفی شدن کشت نمونه ها مطرح می باشد این است که سلول های باکتریایی در هنگام کشت روی محیط، به علت داغ بودن لوپ از میان رفته باشند و به همین علت هیچ باکتری نتوانسته است روی محیط کشت رشد کند. حساسیت FISH برای شناسایی *پسودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های گرفته شده از زخم، ۱۰۰٪ و ویژگی آن ۹۳/۳٪ به دست آمد.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج به دست آمده و با در نظر گرفتن این نکته که حساسیت و ویژگی تکنیک FISH برای شناسایی میکروارگانیسم های مختلف در مقالات در سطح قابل قبولی ذکر شده است، در مواردی هم چون سپتی سمی باکتریایی که صرف زمان ۷۲ –۴۸ ساعت برای شناسایی عامل بیماری و اتخاذ یک روند درمانی مناسب، ممکن است جان بیمار را به مخاطره بیندازد، می توان به راحتی و بدون صرف زمان زیادی از این روش استفاده نمود و به نتیجه حاصل اطمینان داشت.

[1] Background autofluorescense

تشکروقدردانی:

این تحقیق با استفاده از بودجه طرح های تحقیقاتی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام گرفته که قابل تشکر و سپاسگزاری می باشد. با تشکر از پرسنل محترم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری وردآورد کرج، سرکار خانم دکتر فروزنده محجوبی و جناب آقای مهدی شفا که نهایت لطف و همکاری را در تهیه عکس های پایان نامه مبذول داشتند.

فهرست مراجع:

1. Rahme GL, Tan MW, Le L, Wong MS, Tompkins GR, Calderwood BS, et al. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *P roc.Natl.Acad.Sci*.USA.1997; 94:13245-50.
2. Mayhall C.G. The epidemiology of burn wound infections. *Clin. Infect. Dis*.2003; 37:543-50.
3. Churh D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin.Microb.Rev*.2006; **19**(2):403-34.
4. Hogardt M, Trebesius K, Gerger AM, Hornef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J.Clin.Microbiol*.2000; **38**:818-25.
5. Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J.Clin.Methods*.2000; **41**:85-112.
6. Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Curr.Opin.Biotechnol*.2001; **12**:231-6.
7. Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures.*J.Clin.Microbiol*.2000;**38**: 830-8.
8. Russmann H, Kempf VAJ, Koletzko S. Comparision of fuorescent in situ hybridization and conventioal culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J.Clin.Microbiol*.2001; **39**:304-8.
9. Trebesius K, Panthel K, Storbel S. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridization.*Gut*.2000;**46**:608-14.
10. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial .*Microbiol.Rev*.1995; **59**:143-69.
11. Jansen GI, Mooibroek M, Idema J, Harmsen HJM, Welling W. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes.*J.Clin.Microbiol*.2000;**38**:814-7.

۱۲. تاج بخش س. تشخیص سریع استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت(اورئوس) و کوآگولاز منفی و هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های بالینی با استفاده از روش هیبریدیزاسیون در موضع توسط پروب های فلوئورسنت(FISH) . پایان نامه دوره دکترای تخصصی (Ph.D) باکتری شناسی پزشکی به راهنمایی دکتر سید مجتبی موسویان و دکتر علی رضا سمرباف زاده. دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز- ۱۳۸۳ .

13. Delong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* 1989; **243**:1360-3.