خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۲ تابستان ۹۱ (۱۲۳-۱۱۴)

مقاله پژوهشی

لیپوکالین – ۲ نوترکیب انسانی به عنوان عامل مهارکننده رشد باکتری‌ها در جلوگیری از آلودگی پلاکتی

زهرا بخشنده[۱]، مهشید محمدی‌پور[۲]، راحله حلبیان[۳]، پژمان حامدی اصل[۴]، ویدا هاشمی[۵]، محمد محمدزاده[۶]، عباس علی ایمانی فولادی[۷]، ناصر امیری‌زاده[۸]، صالح نصیری[۹]، مهریار حبیبی رودکنار[۱۰]

چکیده

سابقه و هدف

آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی، خطر عفونی عمده پایدار در طب انتقال خون نوین است. این مشکل به ویژه در مورد فرآورده‌های پلاکتی که شرایط مطلوب برای رشد باکتری‌ها را فراهم می‌سازند، نگران‌کننده است. لیپوکالین- ۲، یک پروتئین احتباس‌کننده آهن در پاسخ ایمنی ذاتی است که به سیدروفور باکتری‌ها متصل شده و از جذب آهن توسط آن‌ها جلوگیری می‌کند. این مطالعه برای نشان دادن اثرات آنتی‌باکتریایی لیپوکالین- ۲ به عنوان یک عامل باکتریواستاتیک در جلوگیری از آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ابتدا حداقل غلظت مهارکننده لیپوکالین- ۲ نوترکیب بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق(۲ ± ۲۲ °C) تعیین شد. سپس اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین- ۲ در محیط پلاکتی هم‌زمان با تلقیح باکتری‌های آلوده کننده پلاکتی و نگهداری در دمای اتاق(۲ ± ۲۲ °C) بررسی شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از کشت فرآورده پلاکتی حاوی لیپوکالین-۲ و رقت‌های مختلف باکتری‌ها نشان داد که لیپوکالین-۲ در غلظت ۴۰ ng/mL توانست باعث مهار رشد $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$ CFU/mL استافیلوکوک اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروکوکوس فکالیس شود. هم چنین لیپوکالین-۲ در همین غلظت توانست باعث مهار رشد $۱/۵\times۱۰^{۳}$ CFU/mL استافیلوکوک اورئوس و پروتئوس میرابیلیس گردد.

نتیجه گیری

لیپوکالین-۲ نوترکیب بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های آلوده کننده پلاکتی اثر مهاری دارد و در صورت استفاده در فرآورده‌های پلاکتی، می‌تواند آلودگی باکتریایی این فرآورده و عوارض عفونی ناشی از انتقال پلاکت آلوده را در گیرنده کاهش دهد. ولی برای استفاده از آن، مطالعه‌های بیشتر و تکمیلی مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: **پلاکت‌های خون، عفونت‌های باکتریایی، لیپوکالین‌ها، سیدروفورها**

تاریخ دریافت : ۹۰/ ۱/۳۱
تاریخ پذیرش : ۹۰/۱۰/۱۷

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- دانشجوی PhD ژنتیک مولکولی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- دانشجوی PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی ـ دانشگاه شاهد ـ تهران ـ ایران
۶- دانشجوی PhD خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۷- PhD باکتری‌شناسی ـ دانشیار مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه بقیه‌اله ـ تهران ـ ایران
۸- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۹- PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۱۰- مؤلف مسؤول: PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

مقدمه

پلاکت‌ها نقش اساسی در برقراری هموستاز داشته و به مدت ۱۰-۷ روز در خون گردش می‌کنند، در حالی که فرآورده‌های پلاکتی مدت زمان محدودی قابل نگهداری در دمای اتاق هستند. یکی از علل اصلی محدودیت در زمان نگهداری فرآورده‌های پلاکتی، احتمال آلودگی باکتریایی آن‌ها است. آلودگی باکتریایی هر چند با همه فرآورده‌های خونی همراهی دارد، ولی مشکل اصلی در ارتباط با پلاکت‌ها می‌باشد که در دمای اتاق(°C ۲۴-۲۰) نگهداری می‌شوند(۲، ۱). پلاکت‌ها بر خلاف گلبول‌های قرمز، دمای یخچال را تحمل نمی‌کنند و در صورت نگهداری در این دما، بعد از انتقال به گیرنده به سرعت توسط ماکروفاژهای کبدی پاکسازی(Clearance) می‌شوند(۴، ۳).

مطالعه‌های مختلف بر پایه استفاده از روش‌های کشت حساس، نشان داده‌اند که در حدود ۱ در هر ۳۰۰۰-۲۰۰۰ فرآورده پلاکتی، آلوده به باکتری می‌باشند(۶، ۵، ۱).

منابع آلودگی باکتریایی شامل آلودگی در حین اهدای خون، باکتریمی اهداکننده و آلودگی ناشی از کیسه و سایر تجهیزات تهیه فرآورده پلاکتی است. آلودگی در زمان جمع‌آوری خون، علت اصلی آلودگی باکتریایی فرآورده‌های پلاکتی می‌باشد. اغلب باکتری‌های جدا شده مربوط به ارگانیسم‌های هم‌زیست پوست بوده که در حین خونگیری وارد کیسه می‌شوند(۷).

روش‌هایی که برای تشخیص آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های پلاکتی وجود دارد عبارتند از: رنگ‌آمیزی باکتریایی، اندازه‌گیری سطح pH و گلوکز، کشت باکتریایی و روش‌های مولکولی. روش رنگ‌آمیزی باکتری و اندازه‌گیری سطح pH و گلوکز، ازحساسیت لازم برخوردار نیستند(۸).

سیستم‌های کشت اتوماتیک با حساسیت بالا و دارای مجوز FDA (Food and Drug Administration) برای کنترل کیفی فرآورده پلاکت شامل Bact/ALERT و Palls eBDs می‌باشند که دارای حساسیت CFU/mL ۱۰-۱ باکتری برای تشخیص آلودگی باکتریایی هستند(۹).

با توجه به دمای نگهداری فرآورده پلاکتی، در صورتی که کمترین مقدار باکتری(CFU/mL۱۰>) بتواند وارد کیسه شود، در طی نگهداری در دمای اتاق رشد و تکثیر یافته و به غلظت بسیار بالا ($> 1 \times 10^8$ CFU/mL) می‌رسد(۱). بنابراین اگر بتوان در کیسه‌های پلاکتی عواملی استفاده کرد که از همان زمان ابتدایی تهیه فرآورده پلاکتی بتواند حتی در صورت تلقیح غلظت پایین باکتری، از رشد آن‌ها در طی نگهداری در دمای اتاق جلوگیری کند، می‌توان از حذف تعدادی کیسه پلاکت به علت آلوده بودن و هم چنین از عوارض بالینی ناشی از انتقال پلاکت‌های آلوده جلوگیری کرد. با توجه به احتمال وجود باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و عارض شدن آنافیلاکسی دارویی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت تضمین وجود محصول استریل، راه حل مناسبی به نظر نمی‌آید. از جمله عوامل پیشنهادی که در این مطالعه برای اولین بار بررسی شده است، استفاده از پروتئین باکتریواستاتیک لیپوکالین-۲ نوترکیب در فرآورده پلاکتی می‌باشد که این پروتئین در بدن انسان به طور طبیعی وجود دارد.

لیپوکالین-۲ عضوی از خانواده بزرگ لیپوکالین‌ها می‌باشد که عملکردهای متنوعی مثل انتقال رتینول‌ها، ساخت پروستاگلاندین‌ها، تعدیل پاسخ ایمنی و غیره در مورد آن‌ها گزارش شده است(۱۰). لیپوکالین-۲ که NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) یا لیپوکالین مرتبط با ژلاتیناز نوتروفیل نیز نامیده می‌شود، یک گلیکوپروتئین ۲۵ کیلو دالتونی است و جزو پروتئین‌های ایمنی ذاتی بدن است که بیان آن در سلول‌های مختلف تحت شرایط سخت مثل سوختگی، تولید رادیکال‌های آزاد، سرطان، آسیب‌های کلیوی و قلبی افزایش می‌یابد(۱۲، ۱۱).

اما مهم‌ترین نقشی که برای لیپوکالین-۲ مطرح است، این است که به عنوان یک پروتئین باکتریواستاتیک باعث مهار رشد باکتری‌ها می‌شود(۱۴، ۱۳).

باکتری‌های شایع آلوده‌کننده فرآورده‌های پلاکتی، برای رشد و تکثیر نیاز ضروری به آهن دارند و در شرایطی که میزان آهن محیط محدود باشد، شلاتورهای قوی و اختصاصی برای آهن به نام سیدروفور را ساخته و ترشح می‌کنند که با اتصال به آهن سه ظرفیتی(Fe^{3+}) از طریق رسپتورهای سطحی، آن را به باکتری انتقال می‌دهد.

لیپوکالین-۲ با اتصال به سیدروفور کاتکولات باکتری، مانع از انتقال آهن به باکتری می‌شود و در نتیجه محرومیت از آهن، رشد باکتری‌ها را مهار کرده و به عنوان یک پروتئین باکتریواستاتیک عمل می‌کند(۱۳، ۱۱).

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سویه‌های باکتریایی که برای انجام آزمایش‌ها استفاده شدند شامل استافیلوکوک اپیدرمیدیس ATCC ۱۲۲۲۸ ، استافیلوکوک اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ ، سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ ، اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ ، کلبسیلا پنومونیه ATCC ۱۰۵۳ ، انتروکوک فکالیس ATCC ۲۹۲۱۲ و پروتئوس میرابیلیس ATCC ۱۵۱۴۶ بودند.

تهیه لیپوکالین-۲ نوترکیب:

از لیپوکالین-۲ بیان شده در رده سلولی CHO (Chinese Hamster Ovary) برای انجام آزمایش‌ها و از لیپوکالین-۲ نوترکیب تجاری(آمریکا ، R & D) به عنوان کنترل استفاده شد(۱۵).

بررسی اثرات آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲:

تهیه محلول استاندارد نیم مک فارلند(Mcfarland ۰/۵):

برای استاندارد کردن غلظت تلقیح باکتری به منظور بررسی اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در شرایط *in vitro* ، از سوسپانسیون باکتری دارای کدورت معادل با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. کدورت استاندارد نیم مک فارلند معادل کدورت حدود CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری می‌باشد(۱۶).

برای تهیه محلول استاندارد نیم مک فارلند؛ ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱/۱۷۵٪ کلرور باریم($BaCl_2$) دی‌هیدراته در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و با اسید سولفوریک ۱٪ ، حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول به طور کامل مخلوط و در لوله دربسته در محیط تاریک نگهداری شد. استاندارد سولفات باریم قبل از هر بار استفاده باید خوب مخلوط شود تا کدورت یکنواختی حاصل گردد و در صورت مشاهده ذرات بزرگ باید استاندارد تازه‌ای تهیه شود. چگالی صحیح محلول نیم مک فارلند با استفاده از اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفتومتر با طول مسیر نوری cm ۱ مشخص می‌شود، جذب در nm ۶۲۵ باید بین ۰/۱۳ - ۰/۰۸ باشد(۱۶).

تهیه سوسپانسیون باکتری دارای کدورتی معادل با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند(Mcfarland ۰/۵):

با استفاده از لوپ استریل، حدود ۲-۱ کلنی از کشت تازه باکتری مورد نظر برداشته و در لوله شیشه‌ای حاوی سرم فیزیولوژی استریل حل شد، سپس روی یک صفحه تیره، کدورت آن با کدورت محلول نیم مک فارلند مقایسه شد و به قدری کلنی باکتری به سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد که کدورت آن با کدورت محلول نیم مک فارلند مشابه گردد. کدورت محلول نیم مک فارلند معادل کدورت $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ mL باکتری در نظر گرفته می‌شود بنابراین سوسپانسیون تهیه شده نیز حدوداً حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ mL تعداد باکتری می‌باشد(۱۶).

تعیین حداقل غلظت لیپوکالین - ۲ مهارکننده رشد باکتری‌ها (Minimum Inhibitory Concentration):

MIC ، حداقل غلظتی از آنتی‌بیوتیک است که بتواند رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند. برای تعیین MIC از روش رقت لوله‌ای(Broth macro dilution) و برای استاندارد کردن غلظت تلقیح باکتری، از محلول استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد(۱۶).

به منظور تعیین MIC ، برای هر باکتری یک سری ۸ تایی از لوله‌های آزمایش شامل ۶ لوله برای رقت‌های مختلف لیپوکالین- ۲ ، یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. مراحل کار به شرح زیر می‌باشد:

ابتدا از محیط رشد باکتریایی مولرهینتون براث، یک میلی‌لیتر درون هر کدام از لوله‌ها ریخته شد. سپس به لوله اول یک میلی‌لیتر لیپوکالین- ۲ با غلظت ng/mL ۱۰۰ اضافه شد(غلظت لیپوکالین- ۲ ، ۱/۲رقیق شده و غلظت آن به ng/mL ۵۰ رسید). پس از مخلوط کردن، یک میلی‌لیتر از محتویات داخل لوله اول به لوله دوم منتقل شد،

این کار تا لوله ششم ادامه یافت. در نهایت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری حاوی کدورتی معادل با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند به همه لوله‌ها به غیر از لوله کنترل منفی اضافه شد(به لوله کنترل مثبت سوسپانسیون باکتری اضافه شد ولی لیپوکالین-۲ اضافه نشد). تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای (۲ ºC ± ۲۲) درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس کدورت آن‌ها به صورت چشمی بررسی شد.

در صورت رشد باکتری، کدورت ایجاد می‌شود. کمترین غلظتی از لیپوکالین-۲ که بتواند بعد از انکوباسیون، رشد قابل مشاهده باکتری را مهار کند، به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود(۱۶). به طور معمول برای تعیین MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی رشد باکتری‌ها، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود (ولی در مورد لیپوکالین-۲ که قرار است برای مهار رشد باکتری‌های تلقیح شونده در محیط پلاکتی و در دمای نگهداری پلاکت‌ها استفاده شود، انکوباسیون لوله‌ها در دمای ۲ ºC ± ۲۲ انجام شده است).

بررسی اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در محیط پلاکتی:

- تهیه فرآورده پلاکتی:

فرآورده‌های پلاکتی تصادفی با اخذ رضایت از اهداکنندگان خون مراجعه کننده به پایگاه تهران به شکل تصادفی انتخاب شدند و به دلیل زمان لازم برای انجام آزمایش‌های غربالگری ویروسی بر روی آن‌ها، پلاکت‌ها ۲۴ ساعت بعد از زمان خونگیری تحویل گرفته شدند.

برای بررسی اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در محیط پلاکتی، از غلظت یکسان این پروتئین بر روی غلظت‌های مختلف باکتری در محیط پلاکتی استفاده شد، به این منظور، یک سری لوله‌های ۱۱ تایی برای هر سویه باکتری در نظر گرفته شد. لوله‌های ۱ تا ۵ حاوی فرآورده پلاکتی، لیپوکالین-۲ و سوسپانسیون رقیق شده باکتری با غلظت‌های مختلف بودند ولی لوله‌های ۶ تا ۱۰ فقط حاوی فرآورده پلاکتی و سوسپانسیون باکتری بوده و به عنوان لوله‌های کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. غلظت باکتری اضافه شده به لوله‌های ۶ تا ۱۰ به ترتیب برابر با غلظت باکتری در لوله‌های ۱ تا ۵ می‌باشد. مراحل کار به شرح زیر است:

ابتدا به همه لوله‌ها ۵ میلی‌لیتر از فرآورده پلاکتی تحت شرایط استریل اضافه شد. سپس به لوله‌های ۱ تا ۵، ۴ میلی‌لیتر لیپوکالین-۲ با غلظت ng/mL ۱۰۰ و از سوسپانسیون رقیق شده ۱ تا ۵ به ترتیب به لوله‌های شماره ۱ تا ۵ به مقدار ۱ میلی‌لیتر اضافه شد(به لوله کنترل منفی باکتری اضافه نمی‌شود). هم چنین از سوسپانسیون رقیق شده ۵-۱ به ترتیب به لوله‌های کنترل مثبت شماره ۶ تا ۱۰ به مقدار ۱ میلی‌لیتر اضافه شد. غلظت باکتری در لوله‌های ۶ تا ۱۰ به ترتیب برابر با غلظت باکتری اضافه شده به لوله‌های ۱ تا ۵ می‌باشد با این تفاوت که به لوله‌های ۶ تا ۱۰ ، لیپوکالین-۲ اضافه نشده است(جدول ۱).

در نهایت همه لوله‌ها به مدت ۴ روز در دمای اتاق (۲ ºC ± ۲۲) روی شیکر نگهداری شدند(در لوله‌ها نیمه باز گذاشته شد تا امکان تبادل هوا وجود داشته باشد). در روز پنجم، mL ۰/۱ از همه لوله‌ها روی پلیت LB (Luria Bertani) آگار کشت داده شد سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و از لحاظ رشد باکتری بررسی شدند(علت نگهداری لوله‌ها به مدت ۴ روز این است که در اکثر کشورها، فرآورده‌های پلاکتی تا ۵ روز در دمای اتاق نگهداری می‌شوند البته در کشور ایران این زمان ۳ روز می‌باشد).

از سوسپانسیون اولیه باکتری که دارای کدورتی معادل با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند بود، رقت‌های مختلف(۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰۰) تهیه و به لوله‌ها(که از قبل حاوی پلاکت و لیپوکالین- ۲ بودند) اضافه شد. به این ترتیب غلظت نهایی باکتری به میزان ۱/۱۰ رقت‌های ذکر شده و به شرح زیر بود:

در لوله شماره ۱ و ۶ غلظت باکتری در حدود CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$.

در لوله شماره ۲ و ۷ غلظت باکتری در حدود CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$.

در لوله شماره ۳ و ۸ غلظت باکتری در حدود CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$.

جدول ۱: بررسی آثار آنتی‌باکتریایی لیپوکالین- ۲ در محیط پلاکتی. لوله‌ها به مدت ۴ روز در دمای ºC ۲ ± ۲۲ روی شیکر انکوبه شدند و پس از آن روی پلیت LB آگار کشت داده شدند. لوله‌های ۱۰-۶، کنترل مثبت می‌باشند که فاقد لیپوکالین- ۲ بوده و تعداد باکتری آن‌ها به ترتیب برابر با تعداد باکتری در لوله‌های ۵-۱ می‌باشد، لوله شماره ۱۱، کنترل منفی است.

لوله / ماده اضافه شده	۱ (mL)	۲ (mL)	۳ (mL)	۴ (mL)	۵ (mL)	۶ (mL)	۷ (mL)	۸ (mL)	۹ (mL)	۱۰ (mL)	۱۱ (mL)
فرآورده پلاکتی	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
لیپوکالین- ۲ (۱۰۰ ng/mL)	۴	۴	۴	۴	–	–	–	–	–	–	–
سوسپانسیون رقیق شده باکتری	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	–

در لوله شماره ۴ و ۹ غلظت باکتری در حدود CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$.

در لوله شماره ۵ و ۱۰ غلظت باکتری در حدود CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۲}$.

یافته‌ها

MIC (حداقل غلظت مهارکننده) لیپوکالین-۲ برای باکتری‌های آلوده‌کننده پلاکت:

لوله‌های حاوی محیط کشت باکتریایی مایع، لیپوکالین- ۲ و سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق(ºC ۲ ± ۲۲) انکوبه شدند و سپس از لحاظ کدورت (رشد باکتری) به صورت چشمی بررسی شدند. MIC ، کمترین غلظتی از لیپوکالین-۲ است که توانسته رشد باکتری را مهار کند(فاقد کدورت قابل مشاهده باشد). لوله کنترل مثبت بعد از انکوباسیون به طور واضح کدر شده و لوله کنترل منفی فاقد کدورت بود(جدول ۲).

اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در محیط پلاکتی:

لوله‌های حاوی کنسانتره پلاکتی، لیپوکالین- ۲ و سوسپانسیون رقیق شده باکتری بعد از ۴ روز انکوباسیون در دمای اتاق (ºC ۲ ± ۲۲) ، کشت داده شدند.

نتایج حاصل از کشت نشان می‌دهد که لیپوکالین-۲ در غلظت ۴۰ ng/mL ، باعث مهار رشد CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$ استافیلوکوک اپیدرمیدیس، کلبسیلا پنومونیه، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و انتروکوک فکالیس در محیط پلاکتی شده هم چنین لیپوکالین-۲ در همین غلظت (۴۰ ng/mL) باعث مهار رشد CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ استافیلوکوک اورئوس و پروتئوس میرابیلیس شده است(جداول ۳ و ۴).

جدول ۲: MIC لیپوکالین-۲ نوترکیب بر روی رشد باکتری‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ºC ۲ ± ۲۲ . لوله کنترل منفی فاقد کدورت و لوله کنترل مثبت به طور واضح کدر شده بود.

سویه باکتری	غلظت باکتری (CFU/mL)	حداقل غلظت مهارکننده لیپوکالین-۲ (ng/mL)
استافیلوکوک اپیدرمیدیس	$۱/۵ \times ۱۰^{۸}$	۶/۲۵
استافیلوکوک اورئوس	$۱/۵ \times ۱۰^{۸}$	۱۲/۵
سودوموناس آئروژینوزا	$۱/۵ \times ۱۰^{۸}$	۱۲/۵
اشریشیا کلی	$۱/۵ \times ۱۰^{۸}$	۱۲/۵
کلبسیلا پنومونیه	$۱/۵ \times ۱۰^{۸}$	۱۲/۵
انتروباکتر فکالیس	$۱/۵ \times ۱۰^{۸}$	۶/۲۵
پروتئوس میرابیلیس	$۱/۵ \times ۱۰^{۸}$	۱۲/۵

نتایج به دست آمده از کشت باکتری‌ها در محیط پلاکتی در حضور لیپوکالین-۲:

لوله‌های ۶ تا ۱۰ ، لوله‌های کنترل مثبت هستند که فاقد

جدول ۳: اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در محیط پلاکتی

شماره لوله / سویه باکتری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
استافیلوکوک اپیدرمیدیس	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
استافیلوکوک اورئوس	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
اشریشیا کلی	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
کلبسیلا پنومونیه	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
انتروکوک فکالیس	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
پروتئوس میرابیلیس	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−

(+ : رشد باکتری، − : عدم رشد باکتری)

جدول ۴: غلظت مهارکننده لیپوکالین-۲ بر روی رشد باکتری‌های تلقیح شده در محیط پلاکتی

سویه باکتری	غلظت باکتری مهار شونده (CFU/mL)	غلظت مؤثر لیپوکالین- ۲ (ng/mL)
استافیلوکوک اپیدرمیدیس	$۱/۵ \times ۱۰^{۴}$	۴۰
استافیلوکوک اورئوس	$۱/۵ \times ۱۰^{۳}$	۴۰
سودوموناس آئروژینوزا	$۱/۵ \times ۱۰^{۴}$	۴۰
اشریشیا کلی	$۱/۵ \times ۱۰^{۴}$	۴۰
کلبسیلا پنومونیه	$۱/۵ \times ۱۰^{۴}$	۴۰
انتروکوک فکالیس	$۱/۵ \times ۱۰^{۴}$	۴۰
پروتئوس	$۱/۵ \times ۱۰^{۳}$	۴۰

لیپوکالین-۲ بوده و غلظت باکتری در آن‌ها به ترتیب برابر با غلظت باکتری تلقیح شده به لوله‌های ۱ تا ۵ می‌باشد و لوله شماره ۱۱، لوله کنترل منفی است که فقط حاوی پلاکت می‌باشد. در همه لوله‌های کنترل مثبت، باکتری رشده کرده است. در حالی که در لوله‌های آزمایش ۳، ۴ و ۵ که به ترتیب حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$ CFU /mL، $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ CFU /mL و $۱/۵ \times ۱۰^{۲}$ CFU/mL باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس، سومودوناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروکوک فکالیس هستند، رشد باکتری‌ها به علت اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ مهار شده است. هم چنین رشد استافیلوکوک اورئوس و پروتئوس میرابیلیس در لوله‌های ۴ و ۵ که به ترتیب دارای $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ CFU/mL و $۱/۵ \times ۱۰^{۲}$ CFU/mL باکتری هستند به علت اثر مهاری لیپوکالین-۲، منفی می‌باشد.

بحث

زمان کوتاه نگهداری فرآورده پلاکتی، موجب کاهش ذخیره آن شده و سازمان انتقال خون را ملزم به تولید روزانه این فرآورده می‌کند. در سال ۱۹۸۳ ، مدت زمان نگهداری فرآورده‌های پلاکتی تا ۷ روز افزایش یافت ولی این افزایش، باعث افزایش آلودگی باکتریایی شد و به همین علت زمان نگهداری بار دیگر به ۵ روز در سال ۱۹۸۶ کاهش یافت(۱). ولی حتی کاهش زمان نگهداری پلاکت‌ها نیز مشکل آلودگی باکتریایی را به طور کامل حل نکرده است و آلودگی باکتریایی ممکن است هنوز از بزرگترین مشکلات فرآورده‌های پلاکتی جهان باشد که می‌تواند باعث ایجاد شوک عفونی و حتی مرگ گیرنده گردد. باکتری‌ها اغلب در طی مرحله خونگیری به کیسه‌های خون وارد می‌شوند و اغلب میکروارگانیسم‌ها، هم‌زیست پوست هستند. از آن جایی که محلول‌های ضدعفونی کننده پوست، نمی‌توانند به طور مطلق و ۱۰۰٪، پوست را ضدعفونی کنند، مراکز انتقال خون باید آزمایش‌هایی را برای تشخیص و محدود کردن آلودگی باکتریایی فرآورده‌های پلاکتی انجام دهند. با وجود تمام تمهیداتی که در مراحل تهیه فرآورده‌های پلاکتی به منظور

جلوگیری از آلودگی باکتریایی انجام می‌شود، ممکن است اهداکنندگان، باکتریمی بدون علامت داشته باشند و از طرفی دیگر شرایط نگهداری پلاکت در دمای اتاق (۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد)، احتمال آلودگی باکتریایی در روند تولید و به دنبال آن تکثیر باکتری‌ها در طی نگهداری را افزایش می‌دهد.

برخی از روش‌های موجود برای تشخیص آلودگی مثل رنگ‌آمیزی باکتریایی، اندازه‌گیری سطح pH و گلوکز دارای حساسیت پایین می‌باشند. سیستم‌های کشت اتوماتیک با حساسیت بالا و دارای مجوز FDA مثل Bact/ALERT و Palls eBDs برای شناسایی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی کاربرد دارد، در این سیستم نمونه باید ۲۴ ساعت بعد از تهیه فرآورده پلاکتی(۴۸ ساعت بعد از اهدای خون) وارد محیط‌های کشت اختصاصی شود سپس این محیط‌ها تا ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شوند تا در طی این دوره به صورت مرتب از لحاظ رشد باکتری بررسی شوند. ولی این مدت زمان، بیشتر از زمان نگهداری پلاکت(۵ روز در جهان و ۳ روز در ایران) می‌باشد، بنابراین قبل از این که جواب نهایی کشت آماده شود، فرآورده مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سیستم کشت Palls eBDs هم نمونه‌گیری باید ۲۴ ساعت بعد از تهیه فرآورده انجام شود و نتایج آن بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید که بر اساس اندازه‌گیری غلظت گاز اکسیژن، نمونه‌های آلوده به باکتری را تشخیص می‌دهد به طوری که در اثر رشد باکتری‌ها به علت مصرف گاز اکسیژن، غلظت آن کاهش می‌یابد. سیستم کشت Palls eBDs فقط قابلیت شناسایی باکتری‌های هوازی را دارد(۹). روش‌های مولکولی از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار هستند ولی از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیستند.

درصورتی که توسط روش‌های موجود، فرآورده پلاکتی آلوده به باکتری شناسایی شود، به هیچ وجه قابل تزریق به بیمار نبوده و باید حذف گردد. به این صورت فرآورده‌ای که با زحمت فراوان تهیه شده است، بدون استفاده حذف می‌شود ولی اگر از همان ابتدا در داخل کیسه پلاکتی عوامل ضد تکثیر باکتری وجود داشته باشد، حتی در صورت تلقیح اولیه باکتری، مانع رشد و تکثیر آن خواهد شد. در این مطالعه برای اولین بار امکان استفاده از خاصیت آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ برای کاهش آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها بررسی شده است. اگرچه در مطالعه‌های قبلی، خاصیت آنتی‌باکتریایی این پروتئین ثابت شده است؛ گوتز در سال ۲۰۰۲ نشان داد که لیپوکالین-۲، یک پروتئین باکتریواستاتیک است که از طریق اتصال به Chalate-type ferric siderophor ، باعث مهار رشد باکتری‌ها می‌گردد(۱۱). نتایج تحقیقات فلو و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۴ این نتیجه را تایید کرد که لیپوکالین-۲ با احتباس آهن در پاسخ ایمنی ذاتی علیه باکتری‌ها دخالت دارد(۱۴). در مطالعه مشابه دیگری اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ در موش‌ها تایید شده است، برگر و همکارانش برای بررسی نقش لیپوکالین-۲ در ایمنی ذاتی به صورت *in vivo* از مدل موشی استفاده کردند و نشان دادند موش‌هایی که در آن‌ها ژن لیپوکالین-۲ خاموش شده است(-/-Lcn2)، در مقایسه با موش‌های وحشی (+/+Lcn2)، حساسیت بسیار بالایی به عفونت اشریشیا کلی دارند به طوری که بعد از مواجهه با دوز کشنده اشریشیا کلی($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/mL)، ۷۴٪ از موش‌های وحشی زنده ماندند در حالی‌که در مورد موش‌های -/-Lcn2، فقط ۲۱٪ زنده ماندند. هم چنین این گروه برای بررسی اثر آنتی‌باکتریایی لیپوکالین-۲ به صورت *in vitro* ، نوتروفیل-های دو گروه از موش‌های فوق را جدا کرده و در محیط کشت با اشریشیا کلی انکوبه کردند، مشاهده شد که تعداد باکتری‌های زنده مجاور شده با نوتروفیل‌های موش -Lcn2 -/- ، بسیار بیشتر از تعداد باکتری‌های زنده مجاور شده با نوتروفیل‌های موش +/+Lcn2 بود و با اضافه کردن آهن در محیط کشت، اثر مهاری نوتروفیل‌ها بر روی رشد باکتری‌ها از بین می‌رفت(۱۷).

آزمایش‌های ما نیز نشان دادند که لیپوکالین-۲ نوترکیب به صورت *in vitro* ، باعث مهار رشد باکتری‌های شایع آلوده‌کننده پلاکتی می‌شود. مطالعه‌های دیگر تایید می‌کند که لیپوکالین-۲ بر روی باکتری‌هایی که در آلودگی فرآورده‌های پلاکتی مشاهده نشده‌اند نیز اثر مهاری دارد. به طوری که در طی عفونت با هلیکوباکتر پیلوری و

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز بیان لیپوکالین-۲ افزایش می‌یابد(۱۸، ۱۳). هم چنین به دنبال کلونیزه شدن استرپتوکوک پنومونیه در دستگاه تنفسی و کلبسیلا پنومونیه نیز بیان لیپوکالین-۲ افزایش می‌یابد(۱۹). بنابراین لیپوکالین-۲ قادر به مهار رشد و تکثیر طیف وسیعی از باکتری‌ها می‌باشد. این مطالعه اولین مطالعه‌ای است که از یک پروتئین باکتریواستاتیک برای کاهش آلودگی باکتریایی پلاکت‌ها استفاده شده است. البته در یک مطالعه در سال ۲۰۱۰، تاناکا و همکارانش امکان استفاده از یک پلی پپتید باکتریوسید(Bactericide) به نام اپسیلون پلی- ال- لیزین(Є-Poly-L-lysine=Є-PLL) را در فرآورده‌های پلاکتی به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی بررسی کردند. Є-PLL یک پلی پپتید کاتیونی است که در طی تخمیر هوازی یک میکروارگانیسم غیرپاتوژن به وجود می‌آید. این گروه سه سویه استافیلوکوک اورئوس، باسیلوس سرئوس و کلبسیلا اکسی توکا را به فرآورده پلاکتی تلقیح کردند سپس غلظت‌های مختلف Є-PLL را هم اضافه نمودند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که Є-PLL در غلظت µg/mL ۵۰ ، باعث مهار کامل باکتری‌های تلقیحی(۲۰ CFU/mL) می‌گردد(۲۰). در حالی که نتایج ما نشان داد که غلظت مهارکننده لیپوکالین-۲ ، در حد نانوگرم در میلی‌لیتر است.

پلاکت‌ها در کیسه‌هایی نگهداری می‌شوند که امکان تبادل هوا را داشته باشند بنابراین باکتری‌هایی که قادر به رشد در شرایط هوازی می‌باشند و به ویژه باکتری‌های گرم مثبت هم‌زیست پوست، شایع‌ترین باکتری‌های آلوده‌کننده هستند. در این مطالعه نیز اثر مهاری لیپوکالین-۲ روی باکتری‌های شایع در آلودگی پلاکتی بررسی شد. به طوری که لیپوکالین- ۲ در غلظت ng/mL ۴۰ توانست رشد CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۴}$ باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس، از شایع‌ترین باکتری‌های آلوده‌کننده فرآورده پلاکتی را مهار کند. هم چنین لیپوکالین-۲ در غلظت ng/mL ۴۰ ، قادر به مهار رشد CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ باکتری استافیلوکوک اورئوس شد که از باکتری‌هایی می‌باشد که در صورت آلودگی فرآورده پلاکتی و انتقال به گیرنده، به احتمال زیاد شوک عفونی را به دنبال دارد. در مورد بقیه سویه‌های مورد بررسی هم اثر مهاری قابل توجهی به دست آمد که در قسمت نتایج ذکر شده است.

نتیجه‌گیری

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در کیسه‌های پلاکتی جهت تضمین وجود محصول استریل، راه حل مناسبی به نظر نمی‌رسد، ترس از عارض شدن آنافیلاکسی دارویی در ازای جلوگیری از سمیت باکتریایی، از علل عدم استقبال از این روش می‌باشد. نتایج اولیه ما نشان داد که استفاده از لیپوکالین-۲ به عنوان پروتئین باکتریواستاتیک برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی فرآورده‌های پلاکتی، راه حل معقولی به نظر می‌رسد. لیکن برای استفاده از این پروتئین به عنوان عامل ضد باکتریایی، مطالعه‌های بیشتر و تکمیلی لازم است. این مطالعه‌ها می‌تواند شامل بررسی اثرات سوء لیپوکالین-۲ بر روی پلاکت‌ها، اثر پروتئین مذکور در عملکرد طبیعی پلاکت‌ها و تاثیر آن در میزان بقای پلاکت‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خون شناسی و بانک خون مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون بوده و با حمایت مالی سازمان انتقال خون ایران در مرکز تحقیقات این سازمان به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از رئیس محترم سازمان انتقال خون ایران و پرسنل پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران به دلیل همکاری در تهیه پلاکت و از خانم فریده دکترزاده، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References :

1- Mathai J. Problem of bacterial contamination in platelet concentrates. Transfus Apher Sci 2009; 41(2): 139-44.
2- Satake M, Mitani T, Oikawa S, Nagumo H, Sugiura S, Tateyama H, *et al*. Frequency of bacterial contamination of platelet concentrates before and after introduction of diversion method in Japan. Transfusion 2009; 49(10): 2152-7.
3- Wandall HH, Hoffmeister KM, Sørensen AL, Rumjantseva V, Clausen H, Hartwig JH, *et al*.

Galactosylation dose not prevent the rapid clearance of long-term, 4 0C –stored platelets. Blood 2008 ; 111(6): 3249-56.
4- Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability: deleterious effect of refrigerated storage. N Engl J Med 1969; 280(20): 1094-8.
5- Vedy D, Robert D, Canellini G, Waldvogel S, Tissot JD. Bacterial contamination of platelet concentrates: pathogen detection and inactivation methods. Hemtology Reviews 2009; 1(1): 22-8.
6- Larsen CP, Ezligini F, Hermansen NO, Kjeldsen-Kragh J. Six years experience of using the BacT/ALERT system to screen all platelet concentrates, and additional testing of outdated platelet concentrates to estimate the frequency of false-negative results. Vox Sang 2005; 88(2): 93-7.
7- Blajchman MA. Bacterial contamination of cellular blood components: risks, sources and control. Vox Sang 2004; 87 Supple1: 98-103.
8- Hogman CF, Gong J. Studies of one invasive and two noninvasive methods for detection of bacterial contamination of platelet concentrates. Vox Sang 1994; 67(4): 351-5.
9- Schmidt M, Karakassopoulos A, Burkhart J, Deitenbeck R, Asmus J, Müller TH, *et al.* Camparison of three bacterial detection methods under routin condition. Vox Sang 2007; 92(1): 15-21.
10- Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. Biochem J 1996; 318(Pt 1): 1-14.
11- Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore mediated iron acquisition. Mol Cell 2002; 10(5): 1033-43.
12- Lannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, Lavorgna A, Crescenzi E, Vascotto C, *et al*. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(37): 14058-63.
13- Alpízar-Alpízar W, Laerum OD, Illemann M, Ramírez JA, Arias A, Malespín-Bendaña W, *et al*. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL/Lcn2) is upregulated in gastric mucosa infected with Hellicobacter pylori. Virchows Arch 2009; 455(3): 225-33.
14- Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. Nature 2004; 432(7019): 917-21.
15- Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, *et al*. Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Acts as a Protective Factor against H_2O_2 Toxcicity. Arch Med Res 2008; 39(6): 560-6.
16- Baron EJ, Finegold SM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. St Louis, MO: The C.V. Mosby Company; 1990. p. 171-80.
17- Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, *et al*. Lipocalin 2-deficient mice exhibite increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(6): 1834-9
18- Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, Sato S, *et al.* Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. J Immunol 2008; 181(12): 8521-7.
19- Chan YR, Liu JS, Pociask DA, Zheng M, Mietzner TA, Berger T, *et al*. Lipocaline 2 is required for pulmonary host defense against Klebsiella infection. J Immunol 2009; 182(8): 4947-56.
20- Tanaka S, Hayashi T, Tateyama H, Matsumura K, Hyon SH, Hirayama F. Application of the bactericidal activity of e-poly-L-lysin to the storage of human platelet concentrates. Transfusion 2010; 50(4): 932-40.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 9(2):114-123

Original Article

Recombinant Human Lipocalin 2 as an antibacterial agent to prevent platelet contamination

Bakhshandeh Z.[1], Mohammadipoor M.[1], Halabian R.[1], Hamedi Asl P.[1], Hashemi V.[2], Mohammadzadeh M.[1], Imani Fooladi A.[3], Amirizadeh N.[1], Nasiri S.[1], Habibi Roudkenar M.[1]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[2]*Shahed University, Tehran, Iran*
[3]*Research Center of Applied Microbiology, Baghiat Allah University, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Bacterial contamination of blood components is the major residual infectious risk in modern blood transfusion medicine. This problem especially concerns platelet concentrates because of their favourable growth conditions. Lipocalin 2 (Lcn2) is an iron-sequestering protein in the antibacterial innate immune response, which binds to the bacterial siderophores and prevents bacterial iron uptake. This study aimed to imply antibacterial property of Lcn2 as a bacteriostatic agent to prevent platelet- bacterial contamination.

Materials and Methods

In this experimental study minimum inhibitory concentration (MIC) of Lcn2 was determined following 24 hour incubation at 20-24°C. Antibacterial effects of Lcn2 was then evaluated in the platelet concentrates medium simultaneously inoculating with variety concentration of the bacteria at 20-24°C.

Results

Following cultivating of platelets-derived products containing Lcn2 and variety concentration of the bacteria, the results revealed that Lcn2 at concentration of 40 ng/ml effectively inhibited the growth of 1.5×10^4 CFU/ml *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. This concentration of Lcn2 also inhibited the growth of 1.5×10^3 CFU/ml *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis.*

Conclusions

Recombinant Lcn2 inhibited growth of variety of platelet-contaminating bacteria. By using Lcn2 in platelet concentrate it may reduce bacterial contamination. However, to use it in clinic further and complementary studies are required.

Key words: Blood Platelets, Bacterial Infections, Lipocalins, Siderophores

Received: 20 Apr 2011
Accepted: 7 Jan 2012

Correspondence: Habibi Roudkenar M., PhD of Biotechnology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *roudkenar@ibto.ir*