

Molecular Identification of Epsilon Toxin-Producing *Clostridium perfringens* in Stool Samples in Patients with Multiple Sclerosis

Asgharzadeh S¹, Amini K²

Abstract

Purpose: Multiple Sclerosis is a vascular disease in the central nervous system. There is evidence that *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes damage to the myelin of the neuronal cells by increasing the permeability of the blood-brain barrier, and therefore contributes to the disease. Therefore, the aim of this study was the molecular identification of *C. perfringens* Epsilon toxin in samples isolated from multiple sclerosis patients using multiplex-PCR.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, 60 stool samples of patients with multiple sclerosis and 60 specimens of healthy individuals were studied. ε-toxin producing *C. perfringens* infection was examined by the M-PCR method after genomic DNA extraction.

Results: of 60 fecal specimens obtained from patients with multiple sclerosis, 11 (18.3%) and 2 (3.3%) samples were positive for 16S rRNA and ε-toxin-encoding gene, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that the prevalence of *C. perfringens* toxigenic strains in MS patients are higher than in the control group, which can indicate the association between the presence of this toxin and MS disease.

Keywords: Multiple sclerosis, *Clostridium perfringens*, ε-toxin, Multiplex-PCR

Received: 2018.05.19 Accepted: 2019.04.18

بررسی مولکولی کلونیزاسیون *Clostridium perfringens* تولیدکننده سم اپسیلون در نمونه‌های مدفوع

بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس

سارا اصغرزاده^۱، کیومرث امینی^۲

هدف: مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی است. شواهدی وجود دارد که سم اپسیلون کلاستریدیوم پرفرنجنس با افزایش نفوذپذیری سد خونی-مغزی باعث آسیب به میلین سلول‌های عصبی می‌شود و لذا در بروز این بیماری نقش دارد. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه، شناسایی مولکولی کلاستریدیوم پرفرنجنس تولیدکننده سم اپسیلون در نمونه‌های جدا شده از مدفوع بیماران مولتیپل اسکلروزیس به روش Multiplex-PCR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-مقطعی که بر روی ۶۰ نمونه مدفوع بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و ۶۰ نمونه مدفوع افراد سالم صورت گرفت، آلودگی به کلاستریدیوم پرفرنجنس مولد ε-توکسین توسط روش M-PCR پس از استخراج DNA ژنومی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از تعداد ۶۰ نمونه مدفوعی دریافت شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس تعداد ۱۱ نمونه (۱۸/۳٪) برای 16S rRNA و ۲ نمونه (۳/۳٪) برای ژن کد کننده ε-توکسین مثبت بودند. تمامی نمونه‌های حاصل از افراد سالم فاقد کلاستریدیوم پرفرنجنس و سم اپسیلون بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، فراوانی سویه‌های کلاستریدیوم پرفرنجنس توکسیژنیک در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس بالا است که این خود می‌تواند بیانگر ارتباط بین وجود این توکسین و بیماری مالتیپل اسکلروزیس باشد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، کلاستریدیوم پرفرنجنس، ε-توکسین، Multiplex-PCR

ORCID: 0000-0002-6419-3417

نویسنده مسئول: کیومرث امینی، dr_kumarss_amini@yahoo.com

آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

۱- کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

مقدمه

مالتیپل اسکروزیس نوعی بیماری مزمن دستگاه اعصاب مرکزی است که با التهاب و از بین رفتن غلاف چربی پوشاننده اعصاب بدن که میلین نامیده می‌شود، همراه است (۱). این تخریب زمانی اتفاق می‌افتد که بخشی از گلبول‌های سفید خون از سد خونی-مغزی (Blood-Brain Barrier) عبور کرده و به سیستم اعصاب مرکزی وارد شوند و غلاف میلین سلول‌های عصبی را به عنوان عوامل بیگانه شناسایی کنند (۵، ۲). این یک بیماری چند عاملی است و اتیولوژی دقیق این بیماری مشخص نیست ولی فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در مستعد کردن افراد به بیماری نقش دارند (۷، ۶). نقش عفونت‌های مختلف از قبیل عفونت‌های ویروسی و باکتریایی در ایجاد این بیماری در شرایط اپیدمیولوژیک مختلف بررسی شده و در هر منطقه، ارتباط این عفونت‌ها با مالتیپل اسکروزیس مشخص شده است (۹، ۸). محققان از شواهد به عمل آمده دریافته‌اند که بیماری مالتیپل اسکروزیس ممکن است از طریق سم تولید شده از باکتری‌های و یا ایمونوپاتوژن‌های آن‌ها در ارتباط باشد. شواهدی وجود دارد که سم اپسیلون گلستریدیوم پرفرنجنس با افزایش نفوذپذیری BBB باعث آسیب به میلین سلول‌های عصبی می‌شود (۵).

گلستریدیوم پرفرنجنس بر اساس توانایی تولید ۴ نوع توکسین اصلی به نام‌های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به ۵ تیپ E تا A طبقه بندی می‌شوند (۶). جایگاه هر کدام از این ژن‌های مولد توکسین و نحوه عملکرد آن‌ها در سلول متفاوت می‌باشد. برخی ژن‌های مولد توکسین مثل ژن آلفا توکسین، *plc* و یا *cpa*، بر روی کروموزوم قرار دارند در حالی برخی دیگر مثل ژن‌های توکسین بتا *cpb* و یا اپسیلون *etx* بر روی پلاسمید واقع شده‌اند. ژن انتروتوکسین *cpe* می‌تواند هم بر روی کروموزوم و هم بر روی پلاسمید قرار گیرد. به غیر از توکسین یوتا که از طریق فعال کردن واکنش‌های داخل سلولی اثرات خود را می‌گذارد بقیه توکسین‌ها از طریق تاثیر بر غشاهای سلولی

نقش خود را ایفا می‌نمایند (۱۰). تیپ A فقط توانایی تولید آلفا توکسین را دارد؛ درحالی‌که تیپ B توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون را تولید می‌کند. تیپ C توانایی تولید توکسین‌های آلفا و بتا، تیپ D آلفا و اپسیلون و تیپ E نیز توکسین‌های آلفا و یوتا را تولید می‌کند. جذب سموم از طریق مخاط روده صورت گرفته و به سرعت در تمام اندام‌ها پخش می‌شود که عامل القای افزایش فشارخون و آب آوردگی در اندام‌های مختلف می‌گردد. *EtX* باعث مرگ سلولی سریع در سلول‌های خاصی که گیرنده لازم را دارند می‌شود. ژن کد کننده توکسین اپسیلون بر روی پلاسمید قرارداد و یک پروتوکسین است که پس از مجاورت با آنزیم‌های گوارشی به ویژه تریپسین پپتید N-ترمینال و C-ترمینال خود را از دست می‌دهد به توکسین فعال شده ناپایدار تبدیل می‌شود (۷). پروتئین فعال شده بسیار سمی است و اثرات کشنده آن، نکروز پوستی و فعال کننده التهاب می‌باشد. همچنین، این سم می‌تواند از طریق خون به سلول‌های مغز برسد و موجب مالتیپل اسکروزیس شود (۳، ۱). بنابراین مطالعات بیشتر در زمینه ارتباط توکسین‌های این باکتری و مالتیپل اسکروزیس حائز اهمیت می‌باشد. لذا، هدف از این مطالعه بررسی مولکولی کلونیزاسیون تیپ B تولیدکننده سم اپسیلون در نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به مالتیپل اسکروزیس می‌باشد (۳).

روش بررسی

این مطالعه توصیفی-مقطعی، از فروردین ۱۳۹۵ لغایت مهر سال ۱۳۹۶ تعداد ۶۰ نمونه مدفوع از افراد مبتلا به مالتیپل اسکروزیس و ۶۰ نمونه مدفوع از افراد سالم (گروه کنترل) مراجعه‌کننده به بیمارستان سینا (تهران) جمع‌آوری گردید. سم اپسیلون ناشی از گلستریدیوم پرفرنجنس تیپ B و تیپ D تولید شده که از قوی‌ترین سموم گلستریدیال بوده که در رتبه بعدی پس از بوتولینوم و تتانوس می‌باشد (۹). جذب سموم از طریق مخاط روده صورت گرفته و به سرعت

² *Clostridium Perfringens*

¹ *Epsilon toxin Clostridium perfringens* Epsilon Toxin (ETX)

ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) الکتروفورز گردید.

اطلاعات پس از جمع آوری در دو گروه به وسیله نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ تجزیه و تحلیل و مقادیر با استفاده از فراوانی و درصد در هر گروه گزارش گردید.

یافته‌ها

۶۰ نمونه مدفوع از بیماران مبتلا به مالتیپل اسکروزیس (شامل ۴۱ نمونه (۶۸/۴٪) از جنس مؤنث و ۱۹ نمونه (۳۱/۶٪) از جنس مذکر) و تعداد ۶۰ نمونه از افراد سالم (۳۲ نمونه (۵۳/۴٪) مدفوع از جنس مؤنث و ۲۸ نمونه (۴۶/۶٪) از افراد مذکر) جمع آوری شدند. دامنه ی سنی بیماران ۷۳-۳۲ سال با میانگین $46 \pm 11/34$ سال بود. در این مطالعه تعداد ۱۱ نمونه (۱۸/۳٪) کلستریدیوم پرفرنجنس برای ژن 16S rRNA مثبت در نظر گرفته شد. از میان تمامی سویه های کلستریدیوم پرفرنجنس شناسایی شده، ۲ نمونه (۱۸/۲٪) حاوی ژن کد کننده توکسین اپسیلون بودند (شکل ۱). در تمامی ۶۰ نمونه مدفوع به دست آمده از افراد گروه کنترل (سالم)، کلستریدیوم پرفرنجنس و توکسین اپسیلون وجود نداشت. در این مطالعه سویه کلستریدیوم پرفرنجنس حامل توکسین اپسیلون ATCC 13124 خریداری شده از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه از میان تمامی ۶۰ نمونه مدفوع به دست آمده از افراد مبتلا به مالتیپل اسکروزیس تعداد ۱۱ مورد (۱۸/۳٪) به کلستریدیوم پرفرنجنس دیده شد. همچنین فراوانی ژن کد کننده توکسین اپسیلون در این نمونه ها برابر ۳/۳٪ بود.

طبق تحقیقات اختلالات روده ای خسته کننده، تلف-کننده وقت و تجربه ای خجالت آور برای بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروزیس است. Zorzon و همکارانش (۲۱) در مطالعه ای اختلالات جنسی را در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروزیس بررسی کرده اند. این محققین دریافتند که اختلالات جنسی بشدت کیفیت زندگی مبتلایان به مولتیپل اسکروزیس را تحت تأثیر قرار

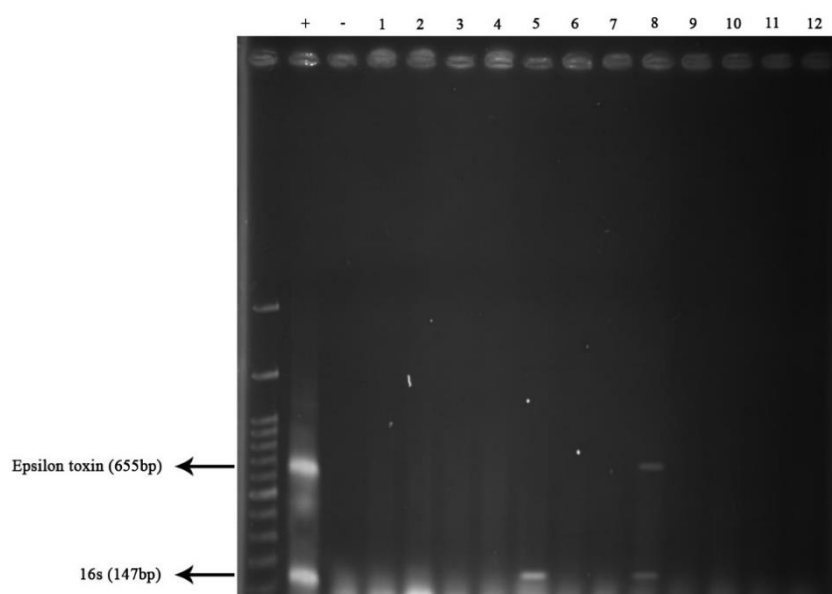
در تمام اندام ها پخش می شود که عامل القای افزایش فشارخون و آب آوردگی در اندام های مختلف می گردد (۱۶، ۱۵).

حجم نمونه با استفاده از روش محاسبه کوکران $n=Z^2(p) \times (1-p)/C^2$ تعیین گردید (۱۲-۶). در این فرمول Z همان شاخص Z (۱/۹۶) برای سطح اطمینان ۹۵٪، p درصد که برابر با ۰/۵ در نظر گرفته شد و C همان کران خطا است که برابر با ۰/۱۳۵ در نظر گرفته شد (۱۷، ۱۵). حجم نمونه برابر با ۵۳ مورد برای هر گروه در نظر گرفته گردید که با در نظر گرفتن ۱۵٪ ریزش نمونه در مطالعه حجم نمونه نهایی برای هر گروه برابر ۶۰ مورد در نظر گرفته شد (۸). وجود بیماری مالتیپل اسکروزیس در بیماران توسط پزشک متخصص بیماری های مغز و اعصاب تأیید شد. در تمامی افراد گروه کنترل هیچ نشانه ای از بیماری نورولوژیک یافت نشد (۱۶).

به منظور تکثیر ژن های هدف (*etx* و *16srna*)، ابتدا DNA ژنومی سویه ها با استفاده از کیت -CinnaPure DNA Positive Bacteria (سینا کلون، ایران) استخراج گردید (۱۴، ۱۳). جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. توالی الیگونوکلئوتیدی از پرایمر موجود در جدول ۱ آورده شده است (۱۵، ۷). پس از BLAST پرایمرهای انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۵/۵ میکرو لیتر PCR Master Mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی Taq DNA Polymerase (0.05 U/µl)، $MgCl_2$ (3 mM) و dNTPs (0.4mM)، ۱ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرو لیتر از DNA الگو (۱۰ Nano Gram) و ۱۰/۵ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانته ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ (۱۸، ۴) با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت Denaturation ثانویه ۹۴ درجه سانتی گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر Annealing ۵۶ درجه برای ۳۰ ثانیه، گام سوم بسط Extension اولیه ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد (جدول ۱). در پایان، محصولات واکنش M-PCR

جدول ۱: توالی پرایمری استفاده شده در این تحقیق به عنوان پرایمر (۴)

ژن	توالی آغازگر (5'→3')	طول قطعه (جفت باز)
<i>16s rRNA</i>	F=5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3' R=5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3'	۱۴۷
<i>etx</i>	F=5'-GCGGTGATATCCATCTATTC-3' R=5'-CCACTTACTTGTCTACTAAC-3'	۶۵۵



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. DNA سایز مارکر؛ ۱۰۰ bp، کنترل منفی؛ آب مقطر و کنترل مثبت، کلستریدیوم پرفرنجنس حامل توکسین اپسیلون-ATCC 13124

نقش دارد، خصوصاً اگر پایه ارتباط ضعیف باشد. Rumah و همکاران (۷) در آمریکا توکسین اپسیلون مترشحه از تایپ B کلستریدیوم پرفرنجنس را از مدفوع بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس جدا نمودند و این اولین مورد جداسازی این تایپ از کلستریدیوم پرفرنجنس از انسان بود. Wagley و همکاران (۱۶) با استفاده از Western blotting نشان دادند که ۲۴٪ سرم در گروه های CD Clinically Definite مالتیپل اسکلروزیس CIS Clinically isolated Multiple Sclerosis syndrome و ON Optic neuritis (۱۲۵ نفر) با Etx واکنش نشان دادند. Miyamoto و همکاران (۱۷) در مطالعه ای تحت عنوان توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس باعث انتشار بیش از حد گلوتامات در هیپوکامپ موش دریافتند که هم تشنج و هم ترشح گلوتامات با تزریق ریولوزول، مهارکننده آزادسازی گلوتامات از پیش سیناپس، کاهش یافتند، که نشان می‌دهد که این سم در افزایش جریان گلوتامات، منجر به تشنج و عوارض نورونی

می‌دهد. در مطالعه دیگری که تحت عنوان ارتباط بین اختلالات خواب و خستگی در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس توسط Attarian (۲۲) انجام گردیده است. در مطالعه ای که توسط Donnell و Hawkins (۲۳) بر روی ناتوانی ۳۸۸ بیمار انجام گرفته است. Brunham و Tremleet (۲۴) در مطالعه‌ای ارتباط بین حس، حرکت و قدرت عضلانی اندام تحتانی را ارزیابی کرده است و چنین نتیجه‌گیری می‌کند که ارتباط معنی‌داری بین وضعیت حسی بدن و تعادل وجود ندارد در حالی که ارتباط بین حرکت و توانایی کنترل بدن هنگام حرکت و قدرت عضلانی اندام تحتانی معنی دار می‌باشد. Klewer و همکارانش (۲۵) در مطالعه ای مشکلات افراد مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس را بررسی کردند که در یک نمونه ۱۹۲۶ نفری تحت مطالعه ۴۴ درصد از فلج و ۴۲ درصد از ضعف و اختلال حس رنج می‌بردند. استیک (۲۶) بیان می‌کند که مولتیپل اسکلروزیس اغلب در شکستن پیوند زناشویی

منابع

1. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2018; 8(3): a028936.
2. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung H-P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Nature Reviews Neuroscience 2002; 3(4): 291-301.
3. Serafini B, Zandee S, Rosicarelli B, Scorsi E, et al. Epstein-Barr virus-associated immune reconstitution inflammatory syndrome as possible cause of fulminant multiple sclerosis relapse after natalizumab interruption. Journal of neuroimmunology 2018; 15; 9-12.
4. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. New England Journal of Medicine 2006; 354(9): 942-55.
5. Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. The Journal of experimental medicine 2004; 199(7): 971-979.
6. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Immunologic research 2002; 25(1): 27-51.
7. Rumah KR, Linden J, Fischetti VA, Vartanian T. Isolation of Clostridium perfringens type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. PLoS One 2013; 8(10): e76359.
8. Nourbakhsh B, Graves J, Casper TC, Lulu S, et al. Dietary salt intake and time to relapse in paediatric multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2016; 87(12): 1350-3.
9. O'connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. Journal of clinical immunology 2001; 21(2): 81-92.
10. Földes A, Kádár K, Kerémi B, Gyires K, et al. Mesenchymal stem cells of dental origin-their potential for antiinflammatory and regenerative actions in brain and gut damage. Current

هیپوکامپ می‌شود. Vartanian و همکاران (۱۸) فراوانی کلسترییدیوم پرفرنجنس و ژن سم اپسیلون را در نمونه های غذاهای افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که از ۳۷ نمونه مواد غذایی، ۱۳/۵٪ برای حضور باکتری و ۲/۷٪ برای ژن سم اپسیلون مثبت بود.

مطالعات اندکی در زمینه ی ارتباط توکسین های این باکتری با این بیماری در جهان انجام شده و در ایران این مطالعه برای اولین بار انجام می‌گردد، که تحقیقات بیشتر می تواند اطلاعات تکمیل تری را در این زمینه در اختیار پژوهشگران قرار دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، فراوانی سویه های توکسیژنیک کلسترییدیوم پرفرنجنس در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس بالا است که این می‌تواند احتمالاً "ارتباط بین وجود این توکسین و ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه کارکنان بیمارستان سینا، همکاری تمام بیماران و افراد سالم شرکت کننده در این پروژه، پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی-میکروبی پاسارگاد (واقع در تهران) و دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه تشکر و قدردانی می‌شود.

- neuropharmacology 2016; 14(8): 914-934.
11. Segal BM, Cohen JA, Antel J. Americas Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis Forum 2017: Environmental factors, genetics, and epigenetics in MS susceptibility and clinical course. *Multiple Sclerosis Journal* 2018; 24(1): 4-5.
 12. Nasserinejad M, Pourhoseingholi MA, Rezasoltani S, Akbari S, et al. Single-nucleotide polymorphism of Exo1 gene is associated with risk of colorectal cancer based on Robust Bayesian approach. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2018; 11(Suppl 1): S146-S148.
 13. Hussain K, Ijaz M, Durrani A, Anjum A, , et al. Bacterial count and predisposing factors of *Clostridium perfringens* (targeting CPA gene) infection along with antimicrobial sensitivity in diarrheic sheep in Pakistan. *Tropical Biomedicine* 2018; 35(2): 434-441.
 14. Linden JR, Ma Y, Zhao B, Harris JM, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes selective death of mature oligodendrocytes and central nervous system demyelination. *MBio* 2015; 6(3): e02513-2514.
 15. Uzal FA, Songer JG. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2008; 20(3): 253-65.
 16. Wagley S, Bokori-Brown M, Morcrette H, Malaspina A, et al. Evidence of *Clostridium perfringens* epsilon toxin associated with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018 :1352458518767327.
 17. Miyamoto O, Sumitani K, Nakamura T, Yamagami SI, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS microbiology letters* 2000; 189(1): 109-113.
 18. Vartanian T, Rumah K, Linden J. Identification of *Clostridium Perfringens* Epsilon Toxin As A Candidate Trigger For New Lesion Formation In Multiple Sclerosis (P6. 151). *Neurology* 2014; 82(10 Supplement): P6-151.
 19. Ebringer A, Hughes L, Rashid T, Wilson C. *Acinetobacter* immune responses in multiple sclerosis: etiopathogenetic role and its possible use as a diagnostic marker. *Archives of neurology* 2005; 62(1): 33-6
 20. Samedly Ii J, Fisher D, Smedley Sayeed S, Chakrabarti G, McClane B. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*: Springer: 2004; 183-204
 21. Zorzon M, Zivadinov R, Bragadin LM, Moretti R, et al. Sexual dysfunction in multiple sclerosis: a 2-year follow-up study. *Journal of the neurological sciences* 2001; 187(1): 1-5.
 22. Attarian HP, Brown KM, Duntley SP, Carter JD, Cross AH. The relationship of sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *Archives of neurology* 2004; 61(4): 525-8.
 23. Mc Donnell G, Hawkins S. An assessment of the spectrum of disability and handicap in multiple sclerosis: a population-based study. *Multiple sclerosis* 2001;7(2): 111-117.
 24. Brunham S, Tremlett H. Assessing Balance in MS: Relationship between motor control and sensory integration. *International Journal of MS care* 2002; 6: 83.
 25. Klewer J, Pöhlau D, Nippert I, Haas J, Kugler J. Problems reported by elderly patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Nursing* 2001; 33(3): 167-71.
 26. Steck B. The psychosocial impact of multiple sclerosis on families and children. *International MS Journal*. 2000; 7(2): 62.