تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس در نمونه‌های بیمارستانی

مرضیه علی قلی[۱]
محمد ایمان عینی[۱*]
فرهاد بنکدار هاشمی[۱]
شادی شاهسون[۱]
فرشته جبل عاملی[۱]
بهرام کاظمی[۲]

۱. گروه میکروب شناسی
۲. مرکز بیولوژی مولکولی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس آرئوس (SA) یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در عفونت‌های بیمارستانی و خارج بیمارستانی می‌باشد. ظهور سویه‌های استاف آرئوس مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف به‌ویژه سویه‌های SA مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) مشکلات فراوانی در درمان عفونت‌های حاصل از ارگانیسم‌های SA ایجاد کرده است، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و دانستن الگوی منطقه‌ای مقاومت برای درمان مناسب عفونت‌های MRSA و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم بسیار ضروری است.

روش بررسی: در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی ۳۳۸ سویه SA جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف با روش DAD، حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) و PCR بررسی شده است.

یافته‌ها: در روش DAD، (۱۶۰/۳۳۸) ۴۷٪ از سویه‌های SA نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند و کمترین مقاومت نسبت به ونکومایسین(۲۰/۳۳۸) ۶٪ بود. در روش PCR (۱۶۲/۳۳۸) ۴۸٪ از سویه‌ها حاوی ژن *mec*A بودند. MIC اگزاسیلین در ۹۳٪ از سویه‌ها بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. سویه‌های MRSA مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۴۰/۵٪)، اریترومایسین (۴۰٪) و سیپروفلوکساسین (۳۸٪) داشتند ولی سویه‌های MSSA مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین (۵٪) و اریترومایسین (۳/۵٪) داشتند.

نتیجه‌گیری: انتخاب آنتی بیوتیک مناسب به منظور درمان صحیح عفونت‌های SA و جلوگیری از بروز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های موثر برعلیه سویه‌های SA حائز اهمیت فراوان است. همچنین تعیین دقیق الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیازمند مطالعه گسترده‌تر با نمونه‌های بیشتر و مراکز درمانی مختلف می‌باشد.

کلمات کلیدی: MRSA، DAD، PCR.

*نشانی: گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۸۸۹۵۵۸۱۰
پست الکترونیک:
emaneini@razi.tums.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

مقدمه

در جنس استافیلوکوکوس، گونه استافیلوکوکوس آرئوس (SA) در همه‌جا از قبیل دستگاه تنفسی و بر روی پوست بسیاری از بزرگسالان حضور دارد، و به‌عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در عفونت‌های بیمارستانی و خارج بیمارستانی مطرح می‌باشد.[۱و۲] ظهور سویه‌های مقاوم مشکلات فراوانی در درمان عفونت‌های حاصل از ارگانیسم SA ایجاد کرده‌است. در طی دودهه گذشته میزان سویه‌های SA مقاوم به متی‌سیلین Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) در مناطق مختلف جهان افزایش یافته است.[۲و۳]

به‌علت بالا بودن میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی سویه‌های MRSA، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و آگاهی از الگوی منطقه‌ای مقاومت به‌منظور راهنمایی مناسب جهت درمان عفونت‌های ایجاد شده به‌وسیله سویه‌های MRSA بسیار ضروری است.[۱] در ایران اطلاعات دقیقی در زمینه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های MRSA وجود ندارد.

هدف این مطالعه تعیین الگوی منطقه‌ای مقاومت سویه‌های مختلف SA [سویه‌های حاوی ژن *mec*A و سویه‌های فاقد آن Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA)] به منظور راهنمایی مناسب جهت درمان عفونت‌های MRSA و کنترل عفونت، می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تعداد ۳۳۸ گونه استافیلوکوکوس آرئوس از نمونه‌های بالینی متفاوت (مثل خون، زخم، ادرار) بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی (ره) جمع‌آوری شده است. گونه‌های استافیلوکوکوس آرئوس براساس رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، واکنش کوآگولاز، حساسیت به دیسک باستیراسین ۰/۰۴ واحد،تست دزوکسی ریبونوکلئاز، مقاومت به پلی‌میکسین و تولید اوره‌آز شناسایی شدند. میزان حساسیت سویه‌های SA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر اساس راهنمای National Committee for Clinical Lab Standards تعیین شد.[۴] حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (دیسک µg ۵)، اریترومایسین(دیسک µg ۱۵)، جنتامایسین (دیسک µg ۱۰)، اگزاسیلین(متی سیلین)(دیسک µg ۱)، ریفامپین(دیسک µg ۵) و ونکومایسین(دیسک µg ۳۰) (BBL ™ Sensi Disc, Sparks, Maryland, USA) با روش Disk Agar Diffusion (DAD) بر روی محیط مولر هینتون‌آگار و حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی یا MIC (Minimum Inhibitory Concentration) آنتی بیوتیک اگزاسیلین به روش Micro Dilution انجام شد. سویه‌های استاندارد از *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 و *Enterococcus feacalis* ATCC29212 به‌عنوان کنترل واکنش استفاده شدند. در روش DAD نتایج به صورت حساس (S)، حساس نسبی (I) و مقاوم (R) ثبت شدند. برای استخراج DNA سویه‌های SA از روش جوشاندن استفاده شد، سه تا پنج کلنی از کشت ۲۴ ساعته سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس در محیط مولر هینتون آگار برداشته و با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل‌کرده به مدت ۱۵ دقیقه در آب‌جوش قرار داده و در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ده دقیقه سانتریفوژ شده و از مایع رویی جهت انجام واکنش PCR استفاده شد. برای تکثیر ژن *mec*A از پرایمرهای *mec*A F 5′- CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG- 3′ و *mec*A R 5′- TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG- 3′ استفاده شد که محصول آن قطعه‌ای به طول ۳۱۰ bp بود. واکنش PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱ X PCR Buffer، ۲/۵ mM $MgCl_2$، ۰/۵ µM Primers، Taq DNA Polymerase 2.5U و ۲ mM dNTP Mix بود. واکنش‌های PCR در ترموسایکلر(مدل اپندورف ۵۳۳۰) و با شرایط [۵ دقیقه در دمای ۹۴ ºC، ۳۰ لوپ (۹۴ºC به مدت ۳۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

ثانیه، $58\ ^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72\ ^{o}C$ به مدت ۴۵ ثانیه) و پنج دقیقه در دمای $72\ ^{o}C$] انجام شد. محصولات PCR با استفاده از ژل الکتروفورز با آگاروز ۱/۵ % آنالیز شدند.

یافته‌ها

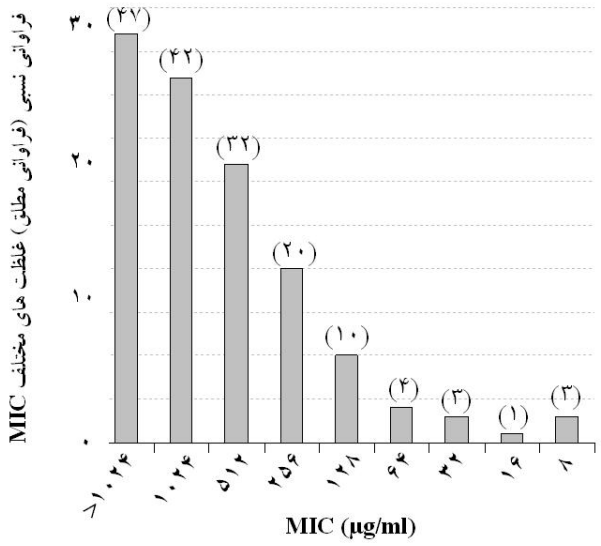
میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس به آنتی بیوتیک های مختلف در روش DAD در جدول شماره۱ ارائه شده است. بیشترین مقاومت مربوط به اگزاسیلین بود، تقریبا نیمی از سویه‌ها به آن مقاوم بودند. همچنین سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس مقاومت کمی به ریفامپین و ونکومایسین داشتند، و حساسیت آنها نسبت به جنتامایسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین نیز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته بود.

در روش DAD (۴۷٪) ۱۶۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس به اگزاسیلین (متی سیلین) مقاوم بودند، اما در روش PCR و MIC (۴۸٪) ۱۶۲ سویه حاوی ژن *mec*A (شکل شماره۱) بودند، که MIC (۹۳٪) ۱۵۱ سویه، بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (نمودار شماره۱).

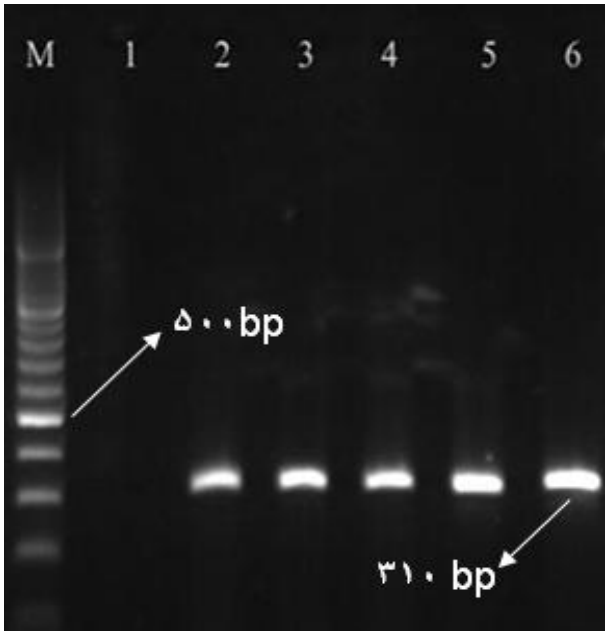
نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت بالای سویه‌های MRSA به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، اریترومایسین و سیپرو فلوکساسین بود (جدول شماره۲) اما بیشتر این سویه ها به ونکومایسین و ریفامپین حساس بودند.

بیشترین مقاومت سویه‌های MSSA مربوط به آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین و اریترومایسین بود(جدول شماره۳)، همچنین این سویه‌ها مقاومت کمی نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین داشتند.

سویه‌های MRSA نسبت به سویه‌های MSSA مقاومت بسیار بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین داشتند (جدول شماره۴). ولی مقاومت سویه‌های MSSA نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بالاتر از سویه های MRSA بود.



نمودار۱- میزان MIC سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس حاوی ژن *mecA* به آنتی بیوتیک اگزاسیلین



شکل۱- آنالیز الکتروفورزی محصولات PCR ژن *mecA* در سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس. M: مارکر، ستون۱: کنترل منفی واکنش، ستون۲: کنترل مثبت واکنش، ستون۳ تا ۶: سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه‌های بالینی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

جدول۱- فراوانی مطلق (فراوانی نسبی *) مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس

واکنش	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جنتامایسین	اگزاسیلین	ریفامپین	ونکومایسین
مقاوم (R)	۱۳۶ (۴۰)	۱۴۹ (۴۴)	۱۴۵ (۴۳)	۱۶۰ (۴۷)	۱۰ (۳)	۲۰ (۶)
حساس نسبی (I)	۴ (۱)	۵ (۱)	۲ (۱)	۴ (۱)	۲ (۱)	۰ (۰)
حساس (S)	۱۹۸ (۵۹)	۱۸۴(۵۵)	۱۹۱ (۵۷)	۱۷۴ (۵۲)	۳۲۶ (۹۶)	۳۱۸ (۹۴)
جمع	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)

*درصدها گرد شده‌اند.

جدول۲- فراوانی مطلق(فراوانی نسبی *) مقاومت سویه‌های MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش DAD

واکنش	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جنتامایسین	ریفامپین	ونکومایسین
مقاوم (R)	۱۳۰ (۸۰)	۱۳۶ (۸۴)	۱۳۷ (۸۵)	۸ (۵)	۲ (۱)
حساس نسبی (I)	۴ (۲/۵)	۱ (۱)	۰ (۰)	۲ (۱)	۰ (۰)
حساس (S)	۲۸ (۱۷/۵)	۲۵ (۱۵)	۲۵ (۱۵)	۱۵۲ (۹۴)	۱۶۰ (۹۹)
جمع	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)

*درصدها گرد شده‌اند

جدول۳- فراوانی مطلق(فراوانی نسبی *) مقاومت سویه‌های MSSA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش DAD

واکنش	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جنتامایسین	ریفامپین	ونکومایسین
مقاوم (R)	۵ (۳)	۱۲ (۷)	۷ (۴)	۱ (۱)	۱۸ (۱۱)
حساس نسبی (I)	۰ (۰)	۴ (۲)	۲ (۱)	۰ (۰)	۰ (۰)
حساس (S)	۱۷۱ (۹۷)	۱۶۰(۹۱)	۱۶۷ (۹۵)	۱۷۵ (۹۹)	۱۵۷ (۸۹)
جمع	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)

*درصدها گرد شده‌اند

جدول۴- فراوانی مطلق(فراوانی نسبی *) مقاومت سویه‌های MSSA و MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

سویه	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جنتامایسین	ریفامپین	ونکومایسین
MSSA	۵ (۱)	۱۲ (۳/۵)	۷ (۲)	۱ (۰/۵)	۱۸ (۵)
MRSA	۱۳۰ (۳۸)	۱۳۶ (۴۰)	۱۳۷ (۴۰/۵)	۸ (۲)	۱ (۰/۵)

*درصدها گرد شده‌اند، کل نمونه‌ها ۳۳۸ بوده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

بحث

بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس مشکلات فراوانی در درمان بیماری‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها در نقاط مختلف جهان از جمله ایران ایجاد کرده است. جهت درمان مناسب و کنترل عفونت‌های بیمارستانی نیاز به دانستن الگوی مقاومت استافیلوکوکوس آرئوس می‌باشد. متاسفانه اطلاعات مناسبی در مورد میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس به آنتی‌بیوتیک های مختلف در ایران وجود ندارد. هدف این مطالعه بررسی میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس به آنتی بیوتیک های رایج در بیمارستان امام خمینی به منظور ارائه راهنمایی جهت درمان مناسب بیماری‌های استافیلوکوکی و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم در جامعه می‌باشد. نتایج این مطالعه حاکی از وجود ژن *mec*A در ۴۸٪ از سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس بود، که این میزان مقاومت مشابه درصد شیوع این سویه‌ها در بیمارستان‌های بزرگ جنوب شرق آسیا،[۵و۶] و بیشتر از کشورهای شمال اروپا و خاورمیانه (به‌جز بیمارستان‌های بزرگ عربستان سعودی) می‌باشد.[۷-۱۳] همچنین این میزان مقاومت کمتر از گزارش ممیشی و همکاران [۱۴] است. این اختلاف احتمالاً به دلیل محدود بودن مطالعه ممیشی به عفونت های خونی در کودکان و استفاده از روش DAD به تنهایی و تنوع نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه است. مقاومت پایین به ریفامپین و ونکومایسین نیز مشاهده شده در این مطالعه مشابه گزارشات موجود از مناطق مختلف جهان می باشد و بیانگر انتخاب این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان گزینه‌ای برای درمان عفونت‌های استافیلوکوکی مطرح می‌باشد. در این مطالعه نیز مشخص شد که همانند سایر مناطق جهان سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس مقاومت بسیار بالایی به داروهای آمینوگلیکوزیدی و سیپروفلوکساسین یافته‌اند. اختلاف مشاهده شده بین نتایج DAD و PCR احتمالاً ناشی از وجود سویه های با حساسیت نسبی نسبت به اگزاسیلین می‌باشد که در روش DAD به صورت حساس نسبی گزارش می‌شوند ولی حاوی ژن *mec*A هستند. روش استاندارد برای شناسایی سویه های استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین روش PCR می‌باشد. در این مطالعه MIC در ۹۳٪ از سویه‌های MRSA، بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که بسیار بالاتر از گزارش‌های موجود در منطقه خاورمیانه می‌باشد،[۱۱-۱۳] و احتمالاً به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک های بتالاکتام در ایران است. نکته قابل توجه مقاومت بالای سویه‌های MRSA در مقایسه با سویه‌هایMSSA نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و سیپروفلوکساسین می‌باشد، که باظهور مقاومت به اگزاسیلین در سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس، میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها نیز به شدت بالا رفته است، این امر احتمالاً می‌تواند بیانگر ارتباطی بین ظهور مقاومت به اگزاسیلین (متی سیلین) و مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند مورد توجه پزشکان جهت انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب به منظور جلوگیری از بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موثر برعلیه استافیلوکوکوس آرئوس قرار گیرد. همچنین تعیین دقیق الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیازمند مطالعه گسترده‌تر با نمونه‌های بیشتر و مراکز درمانی مختلف می‌باشد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

References

1. Chambers H. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Reviews* 1997; 10: 781-91.
2. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 505-20.
3. Cunha BA. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 33-42.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard M7-A5. 5th ed. Villanova PA. USA. National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2004.
5. Westh H, Zinn CS, Rosdahl VT. An International multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in staphylococcus aureus isolates from 15 hospitals in 14 countries. *Microb Drug Resistance* 2004; 10: 169-76.
6. Zinn CS, Westh H, Rosdahl VT. An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital staphylococcus aureus isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. *Microbial Drug Resistance* 2004; 10:160-8.
7. Petinaki E, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Pournaras S, Hatzi F, Kontos F, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the hospitals of Central Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 18: 61-5.
8. Oztop AY, Pinarbasi H, Kocagoz S, Bakici MZ, Bakir M. Molecular genotyping of methicillin-resistant staphylococcus aureus strains in a teaching hospital in turkey. *Microb Drug Resist* 2004; 10:154-59.
9. Araj GF, Uwaydah MM, Alami SY. Antimicrobial susceptibility patterns of bacterial isolates at the American University Medical Center in Lebanon. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 20:151-8.
10. Jumaa PA, Neringer R. A survey of antimicrobial resistance in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates. *J Chemother* 2005; 17: 376-9.
11. Kanj SS, Ghaleb PA, Araj GF. Glycopeptide and oxacillin activity against Staphylococcus aureus isolates at a tertiary care center in Lebanon. *J Med Liban* 2004 52: 8-12.
12. Austin TW, Austin MA, McAlear DE, Coleman BT, Osoba AO, Thaqafi AO, et al. MRSA prevalence in a teaching hospital in Western Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2003; 24: 1313-6.
13. Durmaz B, Durmaz R, Sahin K. Methicillin-resistance among Turkish isolates of Staphylococcus aureus strains from nosocomial and community infections and their resistance patterns using various antimicrobial agents. *J Hosp Infect* 1997: 325-9.
14. Mamishi S, Pourakbari B, Ashtiani C, Hashemi FB. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bloodstream infections at Children's Medical Center, Tehran, Iran 1996–2000. *Int J Antimicrob* 2005; 26: 373-79.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

Determination of antimicrobial resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens

M. Aligholi[1]
M. Emaneini[1*]
F. B. hashemi[1]
Sh. Shasavan[1]
F. Jebelameli[1]
B. kazemi[2]

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences
2. Center for Molecular Biology Research, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Abstract

***Background*:** *Staphylococcus aureus* (SA) is an important cause of nosocomial and community-acquired infections. The emergence of antibiotic resistance, especially in methicillin-resistant SA (MRSA) strains, has caused difficulties in treatment of such infections. The determination of antibiotic resistance patterns, particularly domestic patterns of Iran, is essential for appropriate treatment of MRSA infections and proper infection control measures in our country.

***Methods*:** The antibiotic resistance of 338 SA isolates from various clinical specimens was determined by disk agar diffusion (DAD), minimum inhibitory concentration (MIC) and polymerase chain reaction (PCR) methods.

***Results*:** Using the DAD method, 47% (160/338) of the SA isolates were resistant to oxacillin, and only 6% (20/338) were resistant to vancomycin. By PCR, 48% (162/338) of the isolates had the *mecA* gene. The MIC of oxacillin in 93% of isolates was higher than 256µg/mL. The MRSA isolates, showed a high resistant to gentamicin (40.5%), erythromycin (40%), and ciprofloxacin (38%). However, only a few of the SA isolates showed a high resistance to vancomycin (5%) or erythromycin (3.5%).

***Conclusion*:** The results of this study can provide guidance for physicians toward a more appropriate treatment of SA infections in Iran, thereby preventing the emergence of further antibiotic resistance among SA. Our results also revealed the need for further investigations using a higher number of specimens representing a wider variety of locations to determine the antibiotic resistance patterns in our state more precisely.

Keywords: MRSA, DAD, PCR.

* Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences,
Tel: +98-21-88955810
Email: emaneini@yahoo.com

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]