

بررسی فراوانی ژن های توکسین A و آلزینات در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

حسن ولدبیگی^۱، نورخدا صادقی فرد^{۲*}، رباب رفیعی طباطبایی^۱، عباس ملکی^۲

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد (اسلامی) واحد تهران شمال
(۲) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی (ایلام)

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۵

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا پاتوژنی فرصت طلب و یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی است و در طیف وسیعی از عفونت ها، از عفونت های دستگاه ادراری گرفته تا باکتری می، نقش دارد. این باکتری دارای فاکتورهای پاتوژنی متعددی از جمله اگزو توکسین A، آلزینات، لیپو پلی ساکارید، پیلی، فسفو لیپاز C، الاستاز و الکان پروتئاز می باشد. در این تحقیق فراوانی ژن های اگزو توکسین A و آلزینات در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت های بیمارستانی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این بررسی، پنجاه سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی در بیمارستان های طالقانی و آزمایشگاه مرکزی ایلام و میلاد تهران جمع آوری گردید. ایزوله های مربوطه با روش های بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند، و در مرحله بعد استخراج DNA انجام گرفت. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای هر کدام از ژن های اگزو توکسین A و آلزینات حضور یا عدم حضور ژن های مربوطه با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: در سی و هفت سویه (۷۴ درصد)، ژن اگزو توکسین A و در چهل و شش سویه (۹۲ درصد)، ژن آلزینات مشخص گردید. در ایزوله های جدا شده از عفونت های ادراری که شامل ۳۰ سویه بودند، ژن اگزو توکسین A در ۲۱ سویه (۷۰ درصد) و ژن آلزینات در ۲۶ سویه (۸۶/۶ درصد) مشاهده شد. هم چنین در ایزوله های جدا شده از عفونت های سوختگی که شامل ۲۰ سویه بودند، ژن اگزو توکسین A در ۱۶ سویه (۸۰ درصد) و ژن آلزینات در ۲۰ سویه (۱۰۰ درصد) مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، می توان استنباط نمود که ژن های اگزو توکسین A و آلزینات جزو فاکتورهای ویرولانس باکتری سودوموناس آئروژینوزا به حساب می آیند و ژن آلزینات در عفونت های ادراری و سوختگی نقش مهم تری دارد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، اگزو توکسین A، آلزینات

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: sadeghifard @gmail.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و فرصت طلبی است که به عنوان دومین باکتری بیماری زای رایج در جراحی ها و سومین عامل شایع و متداول عفونت های بیمارستانی بعد از اشریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس است. این باکتری دارای فاکتورهای ویروالانس متعددی از جمله اگزوتوکسین A، آلزینات، لیپوپلی ساکارید، پیلی، فسفولیپاز C، الاستاز و الکالین پروتئاز می باشد، که تولید این فاکتورهای ویروالانس در بیماری زایی آن نقش دارند (۱). از جمله فاکتورهای ویروالانس این باکتری می توان به اگزوتوکسین A اشاره نمود که بیشترین نقش را در بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا دارد. اگزوتوکسین A واجد سه جایگاه (دومین) می باشد. جایگاه I از دو بخش شامل Ia1 از اسید آمینه یک تا ۲۵۲ و بخش Ib از اسید آمینه ۳۶۵ تا ۴۰۴ تشکیل شده است. جایگاه Ia مسئول اتصال به گیرنده سلولی است. نقش جایگاه Ib هنوز مشخص نشده است. جایگاه II از اسید آمینه ۲۵۳ تا ۳۶۴ تشکیل شده است که باعث عبور سم از عرض غشای سلول می شود. جایگاه III از اسید آمینه ۴۰۵ تا ۶۱۳ تشکیل شده و از طریق پنج اسید آمینه انتهایی کربوکسیل باعث ریبوزیله شدن فاکتور طویل سازی EF-2 می گردد (۲-۴). ژن اگزوتوکسین A بر روی کروموزوم باکتری قرار دارد و بیش از ۹۰ درصد گونه های سودوموناس آئروژینوزا این سم را تولید می کنند (۵).

آلزینات از دیگر فاکتورهای ویروالانس سودوموناس آئروژینوزا است که پلی ساکاریدی خطی و بدون انشعاب بوده واز بتا-دی- مانورونیک اسید و اپیمر 5' آن یعنی آلفا-ال- گلوکورونیک اسید که از طریق پیوندهای گلیکوزیدی $4 \rightarrow \beta 1$ متصل شده، تشکیل شده است (۶). مسیر بیوسنتز آلزینات دارای چهار مرحله ۱- سنتز ماده پیشرو ۲- پلیمریزاسیون و انتقال به غشاء سیتوپلاسمی ۳- تغییرات و انتقال به فضای پری پلاسمیک و ۴- خروج از طریق غشای خارجی است. گروه بیوسنتز کننده آلزینات در سودوموناس آئروژینوزا شامل ۱۲ ژن از جمله algA- algD بوده و این ژن ها تحت کنترل پروموتور آلزینات

D قرار دارند (۱۲). عمدتاً ژن های algA، algC و algD آنزیم های لازم برای بیوسنتز پیشرو آلزینات-GDP- مانورونیک اسید را رمزدهی می کنند و از طرفی alg8، algX، algK، alg44 در پلیمریزاسیون، algI، algJ، algF، algG و algL در تغییرات و algE در خروج آلزینات از غشای خارجی نقش دارند (۷،۸).

در این مطالعه به منظور بررسی فراوانی ژن های ویروالانس این باکتری، حضور ژن های ویروالانس توکسین A و آلزینات در میان سویه های جدا شده از نمونه های بالینی مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت:

۵۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزاهای جدا شده از عفونت ادراری و عفونت های سوختگی بیمارستان طالقانی، آزمایشگاه مرکزی ایلام و میلاد تهران جمع آوری گردید. ۳۳ نمونه از شهر ایلام (۱۳ نمونه از آزمایشگاه مرکزی و ۲۰ نمونه از بیمارستان طالقانی)، که نمونه های آزمایشگاه مرکزی مربوط به عفونت های ادراری، نمونه های بیمارستان طالقانی مربوط به عفونت های سوختگی و ۱۷ نمونه از بیمارستان میلاد تهران که مربوط به عفونت های ادراری بودند، ایزوله شدند.

نمونه ها در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون انجام شد. در مرحله بعد بر تست های تاییدی روی محیط های TSI، SIM، سیمون سترات و آزمایشات اختصاصی از جمله لیزین دکربوکسیلاز، اکسیداز، کاتالاز، VP و MR انجام گرفت.

استخراج DNA:

جهت استخراج DNA، ابتدا یک کلونی از باکتری در محیط LB (۱۰ گرم پپتون را با ۵ گرم کلرید سدیم و ۵ گرم عصاره مخمر را در یک ارلن ریخته و به آن ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید و حرارت داده شد تا حل شوند. سپس در لوله آزمایش تقسیم گردید و ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه اتوکلاو شد) تلقیح و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و سپس سوسپانسیون باکتری سانتریفوژ گردید و

از رسوب جهت استخراج DNA استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA استفاده شد، (Genomic DNA Extraction kit شرکت Bioneer).

آزمایش PCR برای ژن های اگزوتوکسین A و آلزینات:

پس از استخراج DNA، هر نمونه تا انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سکانس پرایمرها جهت تکثیر بخشی از قطعات ژن های اگزوتوکسین A و آلزینات که در مطالعات قبلی طراحی گردیده بودند، در ذیل آمده است، (۹-۱۴، ۱۲). این پرایمرها طوری طراحی شده اند که قادرند قطعه ای به طول ۳۹۶ جفت باز برای ژن اگزوتوکسین A و قطعه ای به طول ۵۲۰ جفت باز برای ژن آلزینات را تکثیر نمایند.

پرایمرهای ژن اگزوتوکسین A

پرایمر پیشرو

ETA1 5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3'

پرایمر معکوس

ETA2 5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'

پرایمرهای مورد استفاده در ژن آلزینات:

پرایمر پیشرو

VIC1 5'-TTCCCTCGCAGAGAAAACAT-3'

پرایمر معکوس

VIC2 5'-CCTGGTTGATCAGGTTCGATCT-3'

جهت تکثیر قطعه مورد نظر از ژن های اگزوتوکسین A و آلزینات در یک حجم ۵۰ میکرولیتری ۲/۵ واحد از آنزیم Taq پلی مراز، همراه ۵۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام از دزوکسی نوکلئوتیدهای چهارگانه، یک میکرولیتر از DNA الگو، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH 8/3) و ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم استفاده گردید.

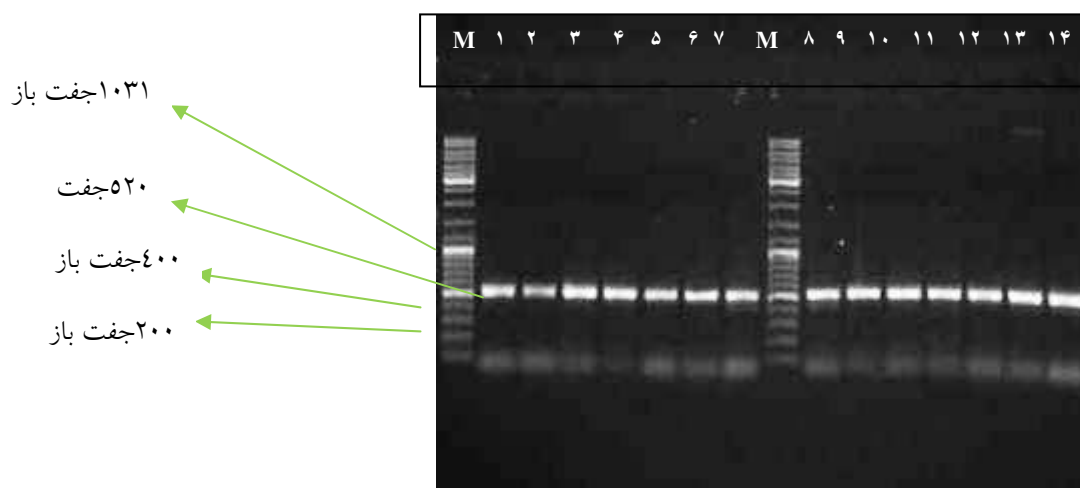
لوله ها را در ترموسایکلر برای ژن اگزوتوکسین A با دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل در، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت و در آخر جهت تکثیر قطعات ناتمام، واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه انجام گردید.

واکنش PCR برای ژن آلزینات همانند برنامه بالا انجام گرفت، با این تفاوت که دمای مرحله اتصال پرایمرها (annealing) ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه انجام شد.

حدود ۱۰-۵ میکرولیتر از محصول به دست آمده از PCR در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و سپس باندها با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت مشاهده گردیدند.

یافته های پژوهش

در این بررسی، ابتدا پنجاه سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی از بیمارستان طالقانی و آزمایشگاه مرکزی ایلام و بیمارستان میلاد تهران جمع آوری گردید. پس از تأیید سویه ها با روش های بیوشیمیایی از DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR انجام گرفت. پس از بررسی نتایج PCR، باندهای به دست آمده با وزن ۳۹۶ جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن اگزوتوکسین A و باندهای به دست آمده با وزن ۵۲۰ جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن آلزینات تأیید گردیدند و به ترتیب به عنوان سویه های حمل کننده ژن های اگزوتوکسین A و آلزینات مد نظر قرار گرفتند. (شکل شماره ۱)



شکل شماره ۱. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعه ژن آلژینات با وزن مولکولی ۵۲۰ جفت باز. ردیف های ۱-۱۴ مربوط به سویه های حمل کننده ژن آلژینات و ردیف های M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

در جدول شماره ۱ فراوانی ژن های اگزوتوکسین A و آلژینات بر حسب تعداد موارد مثبت و منفی در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شده است.

بنا بر این، از مجموع پنجاه سویه سودوموناس آئروژینوزا فراوانی هر کدام از ژن های اگزوتوکسین A و آلژینات به روش PCR تعیین گردید. در سی و هفت سویه (۷۴ درصد) ژن اگزوتوکسین A و در چهل و شش سویه (۹۲ درصد) ژن آلژینات مشخص گردید.

جدول شماره ۱. فراوانی ژن های اگزوتوکسین A و آلژینات بر حسب تعداد موارد مثبت و منفی در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا

نتایج		موارد مثبت		موارد منفی		جمع
ژن های مورد بررسی		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد درصد
ژن اگزوتوکسین A		۳۷	۷۴	۱۳	۲۶	۵۰ ۱۰۰
ژن آلژینات		۴۶	۹۲	۴	۸	۵۰ ۱۰۰

بحث و نتیجه گیری

باکتری و تعیین ارتباط بین نوع عفونت امری ضروری است. در بررسی Eliana Guedes Stehling و همکارانش در سال ۲۰۰۸، بر روی ۱۲۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سیستمیک فیبروزیس و بیماران با عفونت های شدید، نقش ژن آلژینات algD در بیماری زایی تمام سویه های بررسی شده مشخص شد اما ژن algU فقط در ۲۵ درصد از سویه های موکوییدی یا مخاطی پیدا شد. (۵) در مطالعه ای که توسط ntonov و همکاران بر روی آنالیز ژنتیکی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا

سودوموناس آئروژینوزا نوعی باکتری گرم منفی و جزء فلور طبیعی بدن بوده که قادر به ایجاد عفونت در قسمت های مختلف بدن است. این باکتری، یک پاتوژن مهم فرصت طلب محسوب شده و عامل رایج عفونت های بیمارستانی، شامل پنومونی، عفونت های مجاری ادراری، باکتری می و عفونت های شدید در بیماران سوختگی و بیماران مبتلا به سیتیک فیبروزیس محسوب می شود. با توجه به این که سویه های مختلف سودوموناس آئروژینوزا عفونت های مختلف ایجاد می کند، بررسی فراوانی فاکتورهای ویروالانس

A و آلزینات انجام گرفت، مشخص شد که ژن های مربوطه در اکثر سویه ها مورد مطالعه، وجود داشته و فراوانی آن ها تعیین گردید، که فراوانی ژن اگزو توکسین A ۷۴ در صد (۳۷ سویه) و فراوانی ژن آلزینات ۹۲ درصد (۴۶ سویه) مشخص گردیدند. در ایزوله های جدا شده از عفونت های ادراری که شامل ۳۰ سویه بود، ژن اگزو توکسین A در ۷۰ درصد (۲۱ سویه) و ژن آلزینات در ۸۶/۶ درصد (۲۶ سویه) سویه ها مشاهده شد. هم چنین در ایزوله های جدا شده از عفونت های سوختگی که شامل ۲۰ سویه بود، ژن اگزو توکسین A در ۸۰ درصد (۱۶ سویه) و ژن آلزینات در ۱۰۰ درصد (۲۰ سویه) سویه ها مشاهده شد. علاوه بر این از مجموع ۵۰ ایزوله جدا شده از عفونت های ادراری و عفونت های سوختگی، ژن های اگزو توکسین A و آلزینات در ۶۶ درصد (۳۳ سویه) سویه ها مشاهده شد. از مجموع ۲۰ ایزوله جدا شده از عفونت های سوختگی ۸ سویه مربوط به مردان (۴۰ درصد) و ۱۲ سویه مربوط به زنان (۶۰ درصد) بود. از مجموع ۳۰ ایزوله جدا شده از عفونت های ادراری ۱۱ سویه مربوط به مردان (۳۶/۶ درصد) و ۱۹ سویه مربوط به زنان (۶۳/۴ درصد) بود. هم چنین از مجموع ۵۰ ایزوله جدا شده از عفونت های ادراری و سوختگی ۱۹ سویه مربوط به مردان (۳۸ درصد) و ۳۱ سویه مربوط به زنان (۶۲ درصد) مربوط به زنان بود. بنا بر این، نتایج نشان می دهد که ژن آلزینات در عفونت های ادراری و سوختگی نقش مهم تری دارد.

انجام گرفت ۳۶ سویه با روش های آنالیز پلاسمیدی، RAPD-PCR، و شناسایی ژن های ویروالانس galD، toxA، exoS، nail و nal2 انجام گرفت و مشخص گردید ژن های ویروالانس نقش کلیدی در پاتوژنز عفونت دارند. (۱۳)

در مطالعه ای که توسط بهرام امینی و همکاران در سال ۱۳۸۹، بر روی همسانه سازی جایگاه کاتالیک اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت، نشان داد که ۹۰ درصد باکتری های جدا شده دارای اگزوتوکسین A بوده و سوش های جدا شده از ایران نیز با توالی های گزارش شده در بانک ژن بین المللی مشابه بودند. (۳)

در مطالعه ای که توسط Luiz Vicente, Da Silva و همکاران (۱۹۹۹) بر روی سویه های سودوموناس آئروژینوزا در نمونه های کلینیکی از بیماران سیستمیک فیبروزیس برای شناسایی algD ژن GDP مانوز از سودوموناس و تولید محصولات PCR قطعه ۵۲۰ انجام شد، ۱۸۲ نمونه سودوموناس آئروژینوزا و ۲۰ نمونه از گونه های باکتریایی با روش PCR تست شد و ۱۰۰ درصد حساسیت و اختصاصیت نشان دادند. (۹)

بنا بر این، همان طور که در نتایج اشاره شد در این مطالعه که بر روی پنجاه سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیمارستان طالقانی و آزمایشگاه مرکزی ایلام و بیمارستان میلاد تهران از طریق PCR جهت بررسی وجود یا عدم وجود ژن های اگزو توکسین

References

- 1-Mendiratta D, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a hospital from a rural area. The Indian J of Medical Research 2005;121(5):701-3.
- 2-Viloya S, Allured R, John C, Stephen F, Carroll and David B. Structure of exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa at 3.0-Angstrom Resolution 1986;83:1320-4.
- 3-Amini B, Kamali M, Zarei Mahmod abadi A, Mortazavi Y, Ebrahim habibi A, Bayat E, et al. [Cloning of catalytic domain of exotoxin a from pseudomonas aeruginosa] 2010;18:24-33.(persian)

- 4-Claude V, Gallant, Tracy L. Raivio, Joan C. Olson Donald E. Woods and Douglas G. Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP ribosyltransferase activity and cytotoxicity 2000;146:1891-9.
- 5-Guedes Stehling E, Dias W, da Silva D. Study of biological characteristics of pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. Bras J Infect Dis 2008;12(1):86-8.
- 6-Hafiane A, Ravaoarino M. Characterization of pseudomonas aeruginosa

strains isolated from cystic fibrosis patients by different typing methods. *Pathologie Biologie* 2009;5:2769-75.

7-Remminghorst U, Rehm BHA. Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS letters* 2006;580(16):3883-8.

8-Deborah M, Ramsey, Daniel J. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology* 2005;56(2):309-22.

9-Luiz Vicente F, Da Silva F, Jose Eduardo L, Christina Naomi Oda B, Sonia Regina Testa Da Silva R, Tatiana R. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 1999;48: 357-61.

10-Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp LY, Abe P, Jane L. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram negative bacilli from patients with cystic

fibrosis. *J of Clinical Microbiology*, set 2003;41(9):4312-17.

11-Song K, Chan T, Ji Z, Wong S. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* from ocular isolates by PCR using exotoxin A-specific primers. *Molecular & Cellular Probes* 2000;14:199-204.

12-Ashraf A, Khan and Carl E Ceringia. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl & Environ Microbiol* 1994; 3739-45.

13-Robles-Price A, Yian Wong T, Sletta H, Valla S, Neal L. AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J of Bacteriology* 2004;186(21): 7369-77.

14-Matar G, Ramlawi F, Hijazi N, Khneisser I, Abdelnoor A. Transcription levels of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A gene and severity of symptoms in patients with otitis externa. *Current Microbiology* 2002;45:350-4.



A Study on The Frequency of Toxin A, Alginate Genes, And of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains

Valadbeigi H¹, Sadeghifard N^{*2}, Rafiei Tabatabaei R¹, Maleki A²

(Received: 12 Jan. 2011

Accepted: 6 Sep. 2011)

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen and one of the most frequent pathogens in nosocomial infections. It causes different types of infections including urinary tract infections and Bacteremiae. This bacterium has many pathogenic factors including; exotoxin A, lipopolysaccharide, phospholipase C, pili, elastase and alkaline protease. In this study, frequency of exotoxin A and alginate genes in clinical *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from nosocomial infections were analysed.

Materials & Methods: 50 *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated in clinical samples of Ilam hospitals and Milad hospital in Tehran. The isolates were identified by biochemical methods, afterwards DNAs were extracted. Next, using special primers for exotoxin A and alginate genes PCR was applied to detect the presence or non-presence of the related genes.

Findings: According to PCR results, 37 isolates (74%) and 46 ones (92%) had exotoxin A and alginate respectively. Among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from urinary tract infections including 30 isolates, exotoxin A and alginate genes were observed in 21 (70%) , and 26 (86/6%) isolates, respectively. Also, in other strains isolated from burn wound infections including 20 isolates, exotoxin A and alginate genes were detected in 16 (80%) and 20 (100%) isolates.

Discussion & Conclusion: The results of our study confirm that exotoxin A and alginate genes presence is considered an important virulence factor of *pseudomonas aeruginosa*. The results of our study showed that alginate gene is so important in *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from urinary tract infections and burn wound infections.

Keywords: *pseudomonas aeruginosa*, exotoxin A, alginate

1. Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of North Tehran, Tehran, Iran

2. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

*(corresponding author)