بررسی فراوانی ژن های qnr مقاومت به سیپروفلوکساسین در ایزوله های E.coli جدا شده از نمونه بالینی بیمارستان امام خمینی ایلام و میلاد تهران

ندا منصوری جمشیدی*[1]، ایرج پاکزاد[2]، بهمن تبرائی[1]، اعظم حدادی[1]

۱)گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج

۲) گروه میکروب شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۱٤

چکیده:

مقدمه: استفاده وسیع از سیپروفلوکساسین باعث افزایش مقاومت به آن شده است. هدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت به سیپروفلوکساسین در باکتری E.coli وتعیین فراوانی ژن های qnr بود.

مواد وروش ها: ۱۵۰ نمونه بالینی E.coli از بیمارستانهای امام خمینی ایلام و میلاد تهران جمع آوری شد. حساسیت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حضور ژن های qnrA، qnrB و qnrS به روش PCR بررسی شد. با استفاده از دیسک های ترکیبی وجود آنزیم‌های ESBL بصورت فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: از ۱۵۰ نمونه ی مورد بررسی ۶۹ نمونه (۴۶ درصد) به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. ۱۰۶ نمونه (۷۰/۶٪) E.coli حداقل به یکی از کینولون ها مقاومت نشان دادند. فراوانی مربوط به ژن های qnrA، qnrB و qnrS به ترتیب ۲۲ (۳۱/۸٪)، ۳۹ (۵۶/۵٪) و ۲۰ (۲۸/۹٪) بود. ۷ نمونه (۱۰/۱٪) حاوی هر سه ژن qnrA، qnrB و qnrS بودند.۲۰ (۲۸/۹٪) نمونه دارای دو ژن qnrA و qnrB، ۱۱(۱۵/۹٪) نمونه دارای دو ژن qnrB و qnrS و ۸ (۱۱/۵٪) نمونه دارای دو ژن qnrA وqnrS بودند. از ۱۵۰ نمونه E.coli، ۷۶ نمونه (۵۰/۷٪) ESBL مثبت و ۷۴ نمونه (۴۹/۳٪) ESBL منفی بودند.

بحث ونتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی ژن های qnrA، qnrB و qnrS در ایزوله های E.coli مقاوم به سیپروفلوکساسین جدا شده از نمونه های بیمارستانهای ایلام و تهران بالا می باشد

واژه های کلیدی :فلوکساسین ، کینولون، E.coli، مقاومت

* **نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج

Email : mansouri_jamshidi@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-14]

مقدمه

باکتری ای کلای (E.coli) از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی است که در ایجاد عفونت در قسمت های مختلف بدن مثل آپاندیس، دستگاه ادراری تناسلی، پرده صفاق، کیسه صفرا، جراحات و زخم ها نقش دارد(۱-۳). ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی به کینولون ها در میان باسیل های گرم منفی باعث محدودیت کاربرد و سودمندی این آنتی بیوتیک ها می شود(۴, ۵). در بین کینولون ها سیپروفلوکساسین بیشترین تأثیر را بعنوان آنتی بیوتیک نسل دوم فلوروکینولون ها بر ضد گرم منفی و گرم مثبت ها دارد(۶). سیپروفلوکساسین از طریق مهار آنزیم DNA جیراز در باکتری های گرم منفی وتوپوایزومراز IV در باکتری های گرم مثبت، از بازسازی ، ترجمه و ترمیم DNA باکتری جلوگیری می کند(۷, ۸). مقاومت به کینولون ها به واسطه موتاسیون در DNA جیراز زیر واحد A وابسته به کروموزوم می باشد(۹). توپوایزومراز IV اغلب یک آنزیم تترامریک بوده و شامل ۲زیر واحد ParC و ۲ زیرواحد ParE است. در باکتری گرم منفی، توپوایزومراز IV یک هدف ثانویه برای کینولون است(۱۰). ژن هایqnr مسئول مقاومت پلاسمیدی به کینولونها بوده و از اثر مهاری این آنتی بیوتیکها بر آنزیم های DNA جیراز و توپوایزومراز IV جلوگیری می کند(۱۱-۱۳).

در تحقیق هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ ای کلای مقاوم به سیپروفلوکساسیون جدا شده از عفونتهای اکتسابی در بیمارستانها و جامعه به ترتیب ۳۵/۹ و ۴ درصد گزارش گردید (۱۴). Sayed و همکارانش در بین سال های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در عمان ، فراوانی مقاومت به سیپروفلوکساسین در ای کلای را ۲۷/۰۲٪ گزارش نمودند(۱۵). در مطالعه ای دیگر Colodner در سال ۲۰۰۸ مقاومت ای کلای به سیپروفلوکساسین را ۵۰٪ گزارش کرد(۱۶). Santiso و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از ۹۵ گونه بالینی ای کلای ,۷۴ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین (۷۷/۹٪) و ۲۱ گونه حساس به سیپروفلوکساسین (۲۲/۱٪) را مشاهده کردند(۱۷). در مطالعه ای که توسط Zhou وهمکارانش در سالهای ۲۰۰۵-۲۰۰۲ در چین انجام دادند، فراوانی ژن های qnrA ,qnrB وqnrS در ۵۱۴ ایزوله ای کلای را به ترتیب۲(۰/۴٪) , ۶ (۱/۲٪) و۱۴(۲/۷٪) گزارش کردند(۱۸). هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های مقاومت به کینولون ها qnrB, qnrA وqnrS در ایزوله های اشرشیا کلای (ای کلای) ESBL مثبت و منفی جدا شده از عفونت های بالینی در بیمارستان امام خمینی ایلام و میلاد تهران بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه مقطعی ۱۵۰ نمونه ای کلای از عفونت های بیمارستانی بیمارستان های امام خمینی ایلام ومیلاد تهران طی سال ۱۳۹۰ جمع آوری گردید. ایزوله های تایید شده در گلیسرول ۱۵٪ و در دمای °C ۸۰- نگهداری گردیدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های ای کلای به روش دیسک دیفیوژن کربی-بائر ، نسبت به ۴ دیسک آنتی بیوتیکی شامل سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، کلرامفنیکل و نالدیکسیک اسید (HiMedia) انجام گردید. نتایج آنتی بیوگرام هر یک از نمونه ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C براساس جدول CLSI قرائت وتفسیر شد. جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله های تولید کننده ESBL از روش دیسک ترکیبی سفوتاکسیم ۳۰میکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰میکروگرم + کلاولانیک اسید ۱۰ میکروگرم وسفتازیدیم ۳۰ میکروگرم وسفتازیدیم ۳۰ میکروگرم +کلاولانیک ۱۰ میکروگرم (شرکت Mast انگلستان) استفاده شد(۱۳, ۱۹).

استخراج ژنوم و PCR : با استفاده از روش جوشاندن DNA استخراج گردید(۶). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(جدول۱) تکثیر ژن ها در دستگاه ترموسیکل (شرکت اپندروف) انجام شد. سپس محصول PCR بر روی آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید و با استفاده از ترانس لومیناتور، ژل مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-14]

جدول۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت PCR ژنهای qnrB, qnrA وqnrS و دمای آنالینگ

دمای Annealing	نام ژن	سکانس پرایمر	شرکت سازنده	طول قطعه
۵۶°C به مدت ۳۰ ثانیه	qnrA	5-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3 5-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3	CinnaGen	۵۶۲ bp
۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه	qnrB	5-ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA - 3 5-GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT -3	CinnaGen	۵۶۲ bp
۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه	qnrS	5-ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA -3 5- TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC - 3	CinnaGen	۴۱۷ bp

یافته های پژوهش

از ۱۵۰ نمونه ی مورد بررسی ۶۹ نمونه (۴۶ درصد) به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. ۱۰۶ نمونه (۷۰/۶٪) ای کلای حداقل به یکی از کینولون ها مقاومت نشان دادند. از ۱۵۰نمونه ای کلای ۷۶ نمونه (۵۰/۷٪)ESBL مثبت و ۷۴ نمونه (۴۹/۳٪) ESBL منفی بودند. از ۷۶ نمونه ای کلای ESBL مثبت،۵۰ نمونه (۳۴/۷٪) از بیمارستان امام خمینی ایلام و ۲۶ نمونه (۱۶٪) از بیمارستان میلاد تهران بودند و از ۷۴ نمونه ESBL منفی ۱۴نمونه (۸/۳٪) از بیمارستان امام خمینی ایلام و ۶۰ نمونه (۴۱٪) از بیمارستان میلاد تهران بودند (جداول۲ و۳). فراوانی مربوط به ژن های qnrB, qnrA وqnrS به ترتیب ۲۲ (۳۱/۸٪)، ۳۹ (۵۶/۵٪)، ۲۰ (۲۸/۹٪) می باشند.۷ نمونه (۱۰/۱٪) هر سه ژن qnrB, qnrA وqnrS را داشتند.۲۰(۲۸/۹٪) نمونه دارای دو ژن qnrA و qnrB و ۱۱(۱۵/۹٪) نمونه دارای دو ژنqnrB وqnrS و ۸ (۱۱/۵٪) نمونه دارای دو ژن qnrA وqnrS بودند(شکل۱).

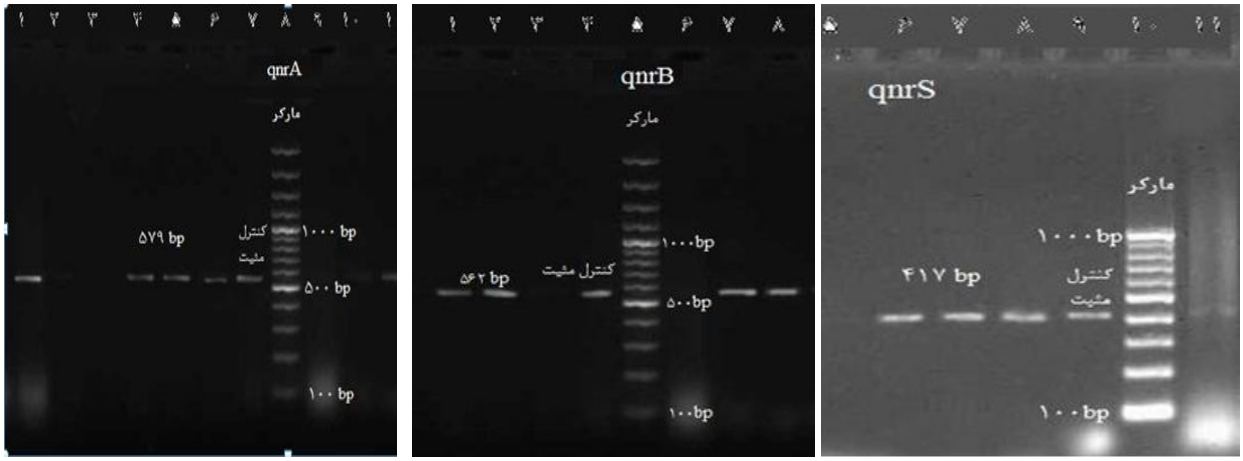
جدول ۲. الگوی مقاومت کینولونی سویه های اشرشیا کلای جدا شده از عفونت های مختلف بر حسب بیمارستان ،جنسیت و بر اساس نتایج دیسک آگار دیفیوژن.

آنتی بیوتیک / بیمارستان	جنسیت		سیپروفلوکساسین	نالدیکسیک اسید	افلوکساسین	کلرامفنیکل
	مرد	زن				
امام خمینی ایلام	۲۰ نمونه (۳۰/۳٪)	۴۰ نمونه (۴۷/۶٪)	۲۴ نمونه (۱۶٪)	۴۰ نمونه (۲۶/۶٪)	۲۴ نمونه (۱۶٪)	۱۴ نمونه (۹/۳٪)
میلاد تهران	۴۶ نمونه (۶۹/۷٪)	۴۴ نمونه (۵۲/۴٪)	۴۵ نمونه (۳۰٪)	۶۴ نمونه (۴۲/۶٪)	۳۶ نمونه (۲۴٪)	۲۰ نمونه (۱۳/۳٪)
جمع کل	۶۶ نمونه (۱۰۰٪)	۸۴ نمونه (۱۰۰٪)	۶۹ نمونه (۴۶٪)	۱۰۴ نمونه (۶۹/۳٪)	۶۰ نمونه (۴۰٪)	۳۴ نمونه (۲۲/۷٪)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-14]

جدول ۳. الگوی ESBL در سویه های اشرشیا کلای جدا شده از عفونت های مختلف بر حسب بیمارستان و بر اساس نتایج دیسک آگار دیفیوژن.

ESBL / سیپروفلوکساسین	ESBL مثبت		ESBL منفی		جمع کل
	امام خمینی ایلام	میلاد تهران	امام خمینی ایلام	میلاد تهران	
	۵۰ نمونه (٪۳۳/۵)	۲۶ نمونه (٪۲۴/۲)	۱۴ نمونه (٪۹)	۶۰ نمونه (٪۴۰/۳)	۱۵۰ نمونه
حساس	۳۵ نمونه (٪۴۶/۶)		۴۰ نمونه (٪۵۳/۳)		۷۵ نمونه(٪۵۲)
مقاوم	۳۸ نمونه (٪۵۵/۱)		۳۱ نمونه (٪۴۴/۹)		۶۹ نمونه(٪۴۸)



A B C

شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR: A، ژن qnrA با طول bp ۵۷۹. B، ژن QnrB با طول bp ۵۶۲. C، ژن qnrS با طول bp ۴۱۷

بحث ونتیجه گیری

شیوع ژن‌های qnrA ,qnrB وqnrS در بین نمونه‌های ای کلای به ترتیب ٪۳۱/۸، ٪۵۶/۵ و ٪۲۸/۹ بود که در حالت کلی ۱۰۶ نمونه (٪۷۰/۶) ای کلای حداقل به یکی از کینولون ها مقاومت نشان دادند. بر اساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، نمونه های ای کلای بیشترین مقاومت را به ترتیب نسبت به نالیدیکسیک اسید (٪۶۹/۳) و سیپروفلوکساسین (٪۴۶) نشان دادند. مقاومت به افلوکساسین وکلرامفنیکل به ترتیب ٪۴۰ و ٪۲۲/۷ بود. Colodner و همکاران مقاومت ای کلای به سیپروفلوکساسین را ٪۵۰ گزارش نمود(۱۶). شیوع ژن های qnrA ,qnrB وqnrS در مطالعه Zhou وهمکارانش در سالهای ۲۰۰۵-۲۰۰۲ در چین در نمونه های ای کلای ٪۰/۴، ٪۱/۲، ٪۲/۷،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-14]

گزارش شده بود که نسبت به تحقیق حاضر شیوع کمتری را نشان می دهند(۱۸). Robicsek و همکارانش در ایالت متحده امریکا بین سال های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۴، که فراوانی ژن qnrA درایزوله های ای کلای ۴٪ گزارش نمودند(۱). از ۱۵۰نمونه ای کلای ۷۳ نمونه (۵۰/۷٪) ESBL مثبت و ۷۷ نمونه (۴۹/۳٪) ESBL منفی بودند. از ۷۳ نمونه اکلای ESBL مثبت،۵۰ نمونه (۳۴/۷٪) از بیمارستان امام خمینی ایلام و ۲۳ نمونه (۱۶٪) از بیمارستان میلاد تهران بودند و از ۷۷ نمونه ESBL منفی ۱۸نمونه (۸/۳٪) از بیمارستان امام خمینی ایلام و ۵۹ نمونه (۴۱٪) از بیمارستان میلاد تهران بودند. در این مطالعه، شیوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نشان داد که ۲۹/۲٪ و ۳۹/۶٪ از نمونه‌های ای کلای به ترتیب به سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند. زینانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ۸۳ ایزوله ای کلای جدا شده از نمونه های بالینی ۴۴٪ ESBL مثبت گزارش نمودند (۲۰). در این مطالعه ۵ نمونه (۶/۸٪) از سویه های ESBL مثبت ای کلای به ترتیب حامل ژن هایqnrA ,qnrBوqnrSبودند. این در حالی است که شیوع این ژن‌ها در بین سویه‌های ESBL منفی ۲/۸٪ بود.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در ایزوله‌های اشرشیا کلای جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان امام خمینی (ره) ایلام و میلاد تهران، ژن‌های qnr نقش مهمی در بروز مقاومت به سیپروفلوکساسین دارند.

سپاسگزاری

بدینوسیله مراتب تشکروقدردانی خودرا ازمعاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایلام به خاطرحمایت مالی اعلام می داریم. و ازهمکاری آقای دکتر رهبر تشکر و قدردانی بعمل می آید

References

1-icsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 2006;6:629-40.

2-os E, Rodriguez-Avial I, Rodriguez-Avial C, Hernandez E, Picazo JJ. High percentage of resistance to ciprofloxacin and qnrB19 gene identified in urinary isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Madrid, Spain. Diagnos Microbiol Infect Dis 2010;67:380-3.

3-zer AH. Transmissible drug resistance in Escherichia coli isolated from poultry and their carcasses in Iran. Cornell Veterin 1980;70:365-71.

4-ap O, Togan T, Yesilkaya A, Arslan H, Haberal M. Antimicrobial susceptibilities of uropathogen Escherichia coli in renal transplant recipients: dramatic increase in ciprofloxacin resistance. Transplant Proc 2013; 45:956-7.

5-kzad I, Ghafourian S, Taherikalani M, Sadeghifard N, Abtahi H, Rahbar M, et al. qnr prevalence in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and none-ESBLs producing Escherichia coli isolated from urinary tract infections in central of Iran. Iran J Basic Med Sci 2011;14:458-64.

6-nkat G, Muller G, Braissant O, Frei R, Tschudin-Suter S, Rieken M, et al. Increasing prevalence of ciprofloxacin resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli urinary isolates. World J Urol 2013;31:1427-32.

7-nsal S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in Escherichia coli clinical isolates. Int J Antimicrob Agent 2011;37:253-5.

8-in JH, Jung HJ, Lee JY, Kim HR, Lee JN, Chang CL. High rates of plasmid-mediated quinolone resistance QnrB variants among ciprofloxacin-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from urinary tract infections in Korea. Microb Drug Resist 2008;14:221-6.

9-llett P, Maxwell A. Novel quinolone resistance mutations of the Escherichia coli DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. Antimicrob Agent Chemotherap 1991;35:335-40.

10-Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of gyrA

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-14]

mutateons determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. BMC Infect Dis 2013;13:8-14.
11-gai Y, Kato JI, Hoshino K, Akasaka T, Sato K, Ikeda H. Quinolone-resistant mutants of escherichia coli DNA topoisom-erase IV parC gene. Antimicrob Agent Chemotherap 1996;40:710-14.
12-met L, Caroff N, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. Pathologie Biologie 2011; 59:151-6.
13-kill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK. J Antimicrob Chemotherap 2005;56:1115-7.
14-hemi SH, Esna-Ashari F, Tavakoli S, Mamani M. The prevalence of antibiotic resistance of enterobacteriaceae strains isolateed in community- and hospital-acquired infections in teaching hospitals of hamadan, west of iran. J Res Health Sci 2012;13:75-80.
15- SQ, Zehra A, Naqvi BS, Shah S, Bushra R. Resistance pattern of ciprofloxacin against different pathogens. Oman Med J 2010;25:294-8.
16-odner R, Kometiani I, Chazan B, Raz R. Risk factors for community-acquired urinary tract infection due to quinolone-resistant E. coli. Infection 2008;36:41-5.
17-tiso R, Tamayo M, Fernandez JL, del Carmen Fernandez M, Molina F, Villanueva R, et al. Rapid and simple determineation of ciprofloxacin resistance in clinical strains of Escherichia coli. J Clin Microbiol 2009;47:2593-5.
18-u TL, Chen XJ, Zhou MM, Zhao YJ, Luo XH, Bao QY. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in Escherichia coli isolates in Wenzhou, Southern China, 2002-2008. Japanese J Infect Dis 2011; 64:55-7.
19-nam SD, Sanders JW, Tribble DR, Rockabrand DR, Riddle MS, Rozmajzl PJ, et al. Posttreatment changes in Escherichia coli antimicrobial susceptibility rates among diarrheic patients treated with ciprofloxacin. Antimicrob Agent Chemotherap 2005; 49:2571-2.
20-iani FR, Meshkat Z, Naderi NM, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae. Iran J Basic Med Sci 2012;15:654-60.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-14]

Evaluating the Frequency of Ciprofloxacin Resistance Qnr Genes in Escherichia Coli Strains Isolated From Clinical Samples of Imam Khomani and Milad Hospitals in Ilam and Tehran, Iran

Mansouri Jamshidi N[1], Pakzad I[2], Tabaraei B[1], Hadadi A[1]*

(Received: 11 May 2013 Accepted: 5 Sep 2013)

Abstract

Introduction: Extensive use of ciprofloxacin has been led to increased resistance to the antibiotic. In the current study, we sought to assess the pattern of ciprofloxacin resistance in Escherichia coli (E. coli) and to determine the frequency of qnr genes.

Materials & Methods: One hundred and fifty E. coli isolates were collected from clinical samples of Imam Khomani and Milad hospitals in Ilam and Tehran, Iran. Susceptibility to ciprofloxacin was evaluated via disk diffusion method. Then, polymerase chain reaction (PCR) procedure was performed by using of specific primers to detect the qnrA ،qnrB و qnrS genes. The presence of ESBL enzymes was phenotypically assessed by combination disk test.

Findings: Of 150 isolates, sixty nine isolates (46%) were resistance to ciprofloxacin. The frequency of qnrA ،qnrB and qnrS genes were 31.8% (22 isolates), 56.5% (39 isolates) and 28.9% (20 isolates), respectively. Seven isolates (10.1%) had all of the three genes (qnrA ،qnrB and qnrS). Twenty (28.9%) isolates had two of the genes (qnrA and qnrB), eleven (15.9%) isolates had another two of the genes (qnrB and qnrS) and eight (11.5%) isolates had two another genes (qnrA and qnrS). Seventy-six isolates were phenotypically ESBLs producing and seventy-four isolates were phenotypically non ESBLs producing strains.

Discussion & Conclusion: This study showed the presence of a high frequency of the ciprofloxacin resistant qnrA, qnrB and qnrS gense in E. coli strains isolated from clinical samples of Imam Khomani and Milad hospitals in Ilam and Tehran.

Keywords: Ciprofloxacin, quinolone, resistance, E.coli

1. Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Dept of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
** (corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-14]