

## 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\*، ایرج پاکزاد<sup>۱</sup>، بهمن تبرائی<sup>۱</sup>، اعظم حدادی<sup>۱</sup>

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج  
 ۲) گروه میکروبی شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۱۴

### 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 و تعیین فراوانی ژن های qnr بود.

**مواد و روش 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 آنزیم های 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 qnrB، qnrA و qnrS به ترتیب ۲۲ (۳۱/۸٪)، ۳۹ (۵۶/۵٪) و ۲۰ (۲۸/۹٪) بود. ۷ نمونه (۱۰/۱٪) حاوی هر سه ژن qnrB، qnrA 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 و qnrS بودند. از ۱۵۰ نمونه E.coli، ۷۶ نمونه (۵۰/۷٪) ESBL مثبت و ۷۴ نمونه (۴۹/۳٪) ESBL منفی بودند.

**بحث و نتیجه 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

## 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 و توپوایزومراز 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 ۲ زیر واحد ParC و ۲ زیر واحد ParE است. در باکتری گرم منفی، توپوایزومراز IV یک هدف ثانویه برای کینولون است (۱۰). ژن های qnr مسئول مقاومت پلاسمیدی به کینولونها بوده و از اثر مهار 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 سیپروفلوکساسین 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 و همکارانش در سالهای ۲۰۰۵-۲۰۰۲ در چین انجام دادند، فراوانی ژن های qnrA، qnrB، و qnrS در ۵۱۴ ایزوله ای کلای را به ترتیب ۲/۴٪، ۶/۱٪ و ۱۴/۷٪ گزارش کردند (۱۸). هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های مقاومت به کینولون ها، qnrB، qnrA و qnrS 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 و میلاد تهران طی سال ۱۳۹۰ جمع آوری گردید. ایزوله های تایید شده در گلیسرول ۱۵٪ و در دمای ۸۰- نگهداری گردیدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های ای کلای به روش دیسک دیفیوژن کربی-باثر، نسبت به ۴ دیسک آنتی بیوتیکی شامل سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، کلرامفنیکل و نالیدیکسیک 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 و تفسیر شد. جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله های تولید کننده ESBL از روش دیسک ترکیبی سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم + کلانولانیک اسید ۱۰ میکروگرم و سفوتازیدیم ۳۰ میکروگرم و سفوتازیدیم ۳۰ میکروگرم + کلانولانیک 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 (جدول ۱) 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.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت PCR ژنهای qnrA, qnrB, qnrS و دمای آنالینگ

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

## یافته های پژوهش

نمونه ESBL منفی ۱۴ نمونه (۳/۸٪) از بیمارستان امام خمینی ایلام و ۶۰ نمونه (۴۱٪) از بیمارستان میلاد تهران بودند (جدول ۲ و ۳). فراوانی مربوط به ژن های qnrA, qnrB, qnrS به ترتیب ۲۲ (۳۱/۸٪)، ۳۹ (۵۶/۵٪)، ۲۰ (۲۸/۹٪) می باشند. ۷ نمونه (۱۰/۱٪) هر سه ژن qnrA, qnrB, qnrS را داشتند. ۳۰ (۲۸/۹٪) نمونه دارای دو ژن qnrA و qnrB و ۱۱ (۱۵/۹٪) نمونه دارای دو ژن qnrB و qnrS و ۸ (۱۱/۵٪) نمونه دارای دو ژن qnrA و qnrS بودند (شکل ۱).

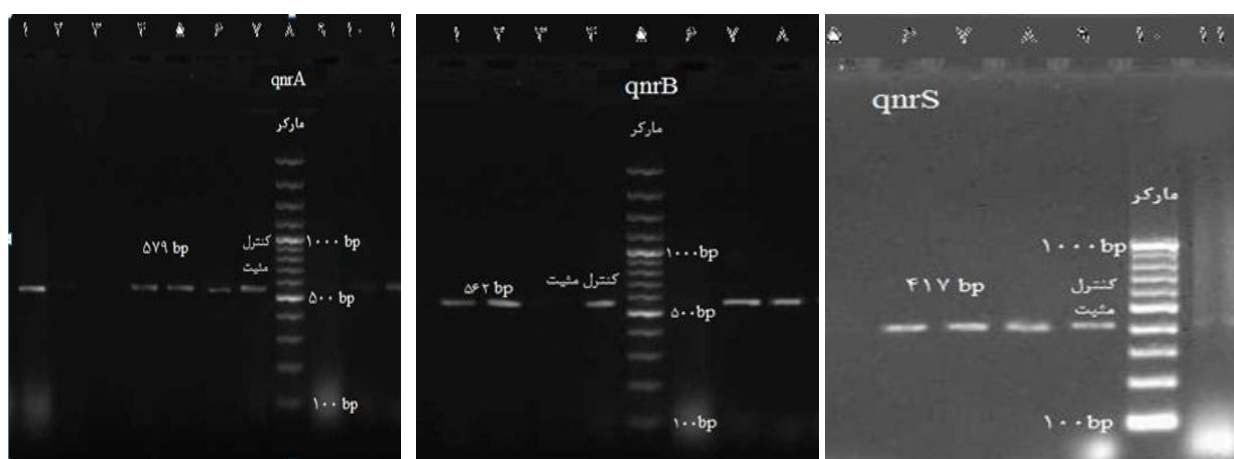
از ۱۵۰ نمونه ی مورد بررسی ۶۹ نمونه (۴۶ درصد) به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. ۱۰۶ نمونه (۷۰/۶٪) ای کلای حداقل به یکی از کینولون ها مقاومت نشان دادند. از ۱۵۰ نمونه ای کلای ۷۶ نمونه (۵۰/۷٪) ESBL مثبت و ۷۴ نمونه (۴۹/۳٪) ESBL منفی بودند. از ۷۶ نمونه ای کلای ESBL مثبت، ۵۰ نمونه (۳۴/۷٪) از بیمارستان امام خمینی ایلام و ۲۶ نمونه (۱۶٪) از بیمارستان میلاد تهران بودند و از ۷۴

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	جنسیت		سیپروفلوکساسین	نالدیکسیک اسید	افلوکساسین	کلرامفنیکل
	مرد	زن				
بیمارستان 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٪)

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.

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



A

B

C

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

### بحث و نتیجه گیری

نالیدیکسیک اسید (۳/۶۹٪) و سیپروفلوکساسین (۴۶٪) نشان دادند. مقاومت به افلوکساسین و کلرامفنیکل 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، و qnrS در مطالعه Zhou و همکارانش در سالهای ۲۰۰۲-۲۰۰۵ در چین در نمونه های ای کلای ۱/۴٪، ۱/۲٪، ۲/۷٪

شیوع ژن های qnrA، qnrB، و qnrS در بین نمونه های 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

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 های *qnrA*, *qnrB* و *qnrS* بودند. این در حالی است که شیوع این ژن ها در بین سویه های ESBL منفی ۲/۸٪ بود.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که در ایزوله های اشرشیا کلای جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان امام خمینی (ره) ایلام و میلاد تهران، ژن های *qnr* نقش مهمی در بروز مقاومت به سیپروفلوکساسین دارند.

### سیاسگزاری

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایلام به خاطر حمایت مالی اعلام می داریم. و از همکاری آقای دکتر رهبر تشکر و قدردانی بعمل می آید

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* در ایزوله های ای کلای ۴٪ گزارش نمودند (۱). از ۱۵۰ نمونه 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 ۱۸ نمونه (۸/۳٪) از بیمارستان امام خمینی ایلام و ۵۹ نمونه (۴۱٪) از بیمارستان میلاد تهران بودند. در این مطالعه، شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف نشان داد که ۲۹/۲٪ و ۳۹/۶٪ از نمونه های ای کلای به ترتیب به سفنازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند. زینانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ۸۳ ایزوله ای کلای جدا

### 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, Sa-deghifard 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*

- 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 topoisomerase 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 multi-drug-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 isolated 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 determination 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.

## 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<sup>1\*</sup>, Pakzad F<sup>2</sup>, Tabaraei B<sup>1</sup>, Hadadi A<sup>1</sup>

(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 genes 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)