

مقاله کوتاه: شیوع ژنوتیپی آمیب آکانتامبا از منابع آب شهر بجنورد

میترا صالحی^۱

چکیده

زمینه و هدف: آمیب آکانتامبا، آمیب آزادزی است که در طبیعت، به‌طور وسیع در منابع محیطی مانند: خاک، آب و گرد و خاک یافت می‌شود. این انگل، عامل کراتیت آمیبی است. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع آمیب آکانتامبا بر اساس ژنوتیپ، در منابع آبی شهر بجنورد بود.

روش تحقیق: ۵۰ نمونه آب، از کانال کشاورزی، رودخانه‌ها و استخرهای شهر بجنورد جمع‌آوری گردید. فیلتراسیون و کشت، بر روی محیط آگار غیر مغذی صورت گرفت؛ سپس بر روی نمونه‌های مثبت، آزمایش PCR به‌عمل آمد. Sequencing، بر روی ۱۰ محصول PCR انجام پذیرفت. تعیین ژنوتیپ، با استفاده برنامه بلاست و همولوژی انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: آمیب آکانتامبا در ۳۴ (۶۸٪) نمونه آب یافت شد. Genotyping ۱۰ نمونه مشخص کرد که ژنوتیپ آکانتامباها، متعلق به T4 (۱۰۰٪) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که آمیب آکانتامبا در محیط اطراف ما وجود دارد و روزانه با این آمیب، بدون اینکه خود متوجه باشیم الوده می‌شویم، بر همین اساس، برای جلوگیری از انتقال این انگل، رعایت نکات بهداشتی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آکانتامبا؛ آب؛ شهر بجنورد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۳؛ ۲۱ (۲): ۲۶۰-۲۶۶.

دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۰۹

^۱ استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.

آدرس: بجنورد- علوم پزشکی خراسان شمالی-جنب بیمارستان امام علی
تلفن: ۰۹۳۶۱۸۸۹۳۸۳ پست الکترونیکی: misssalehi@yahoo.com

مقدمه

آمیب آکانتامبا، آمیب آزادی است که در طبیعت به طور وسیع در منابع محیطی مانند: خاک، آب و گرد و خاک یافت می شود (۱-۴). فرم کیست این آمیب، می تواند سال ها در محیط باقی بماند و به حیات خود ادامه دهد. این آمیب را بر اساس سکانس ژن rRNA، به ۱۷ ژنوتایپ (T1-T17) طبقه بندی کرده اند؛ همچنین توانسته اند این آمیب را از نازوفارنکس و پوست جدا نمایند (۵، ۶).

انسان به طور دائم در تماس با آمیب آکانتامبا قرار دارد. راه های ورود آمیب آکانتامبا به بدن انسان متفاوت است؛ از راه پوست آسیب دیده که در تماس با انگل می باشد، یا از طریق مجاری تنفسی، به صورت کیست موجود در هوا یا باد، وارد بدن می شود و از طریق دستگاه گردش خون، خود را به سیستم عصبی و اندام های دیگر می رساند (۱، ۲).

آمیب آکانتامبا دو نوع آلودگی می دهد: در افراد با نقص سیستم ایمنی و ایدزی، عامل گرانولوماتوز آنسفالیت آمیبی (GAE)^۱ است؛ نوع دیگر آلودگی با این آمیب، کراتیت آمیبی است که ممکن است در افراد سالم به وجود آید. لنزهای تماسی، اصلی ترین عامل خطر در ایجاد کراتیت آمیبی می باشد. علائم کراتیت آمیبی شامل: درد شدید چشم، ترس از نور و التهاب حلقوی قرنیه است. اولین مرحله در بیماری زائی آکانتامبا، چسبیدن به سطح سلول است. مطالعات نشان داده است که در سطح آمیب، گیرنده هایی پروتئینی به نام MBP^۲ با وزن ۱۳۶ کیلودالتون وجود دارد که به گلیکوپروتئین های حاوی مانوز در سطح سلول های هدف متصل می شود (۱، ۳، ۷-۹).

کراتیت آمیبی نیز ممکن است به علت استفاده از آب غیر استریل و یا شنا در استخرهای آلوده رخ دهد. آکانتامبا، می تواند قارچ ها، ویروس ها و باکتری هایی مانند: لژیونلا و مایکوباکتریوم را حمل کرده و وارد بدن میزبان کند و موجب

بیماری زایی و علائم دیگر شود (۱۰، ۱۱).

در ایران، رضاییان و باقری، اولین مورد کراتیت آمیبی را به وسیله روش های کشت، تأیید کردند (۱۲). در سال های اخیر، کراتیت آمیبی در ایران و جهان به علت استفاده از لنزهای تماسی، رو به افزایش است (۶، ۱۰). در ایران حضور آکانتامبا در آب، خاک، گرد و خاک، مدفوع گاو و استخر شنا گزارش شده است (۱۳). محققین، آکانتامبا با ژنوتایپ T4 را از بیوفیلیم^۳ بخش های بیمارستان های تهران جدا کرده اند (۱۴)؛ همچنین آکانتامبا، از آب شیر بیمارستان های ایران جدا شده است (۱۵).

از آنجایی که هیچ اطلاعاتی از شیوع آمیب آکانتامبا از شهر بجنورد در دسترس نیست؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی حضور و ژنوتایپ های آکانتامبا از منابع آبی شهر بجنورد واقع در استان خراسان شمالی انجام گرفت.

روش تحقیق

نمونه گیری

این مطالعه توصیفی، از دی ماه تا اسفندماه ۱۳۹۰ در شهرستان بجنورد انجام گرفت. در این مطالعه، حجم نمونه بر اساس تحقیقات قبلی (۱۸)، در کل، ۵۰ نمونه آب تعیین گردید. نمونه ها به روش نمونه گیری طبقه ای، متناسب با حجم طبقه، از رودخانه ها ۱۸ نمونه، کانال های کشاورزی ۱۴ نمونه، آب شیر ۱۰ نمونه، استخر پارک ها ۵ نمونه و استخرهای شنا ۳ نمونه، به حجم ۵۰۰-۱۰۰ میلی لیتر جمع آوری شد.

کشت

تقریباً ۵۰۰ میلی لیتر آب، با فیلتر نیترات سلولز با منافذ ۰/۴۵ میکرون، فیلتر گردید. برای کشت Monoxenic، فیلتر مرحله قبل بر روی آگار غیر مغذی^۴ حاوی Saline page (PH=7/2-7/4) کشت داده شد. در کنار پلیت، یک خراش ایجاد شد تا زمانی که آمیب در محیط نفوذ می کند، از راه

³ Biofilm⁴ NNA Non Nutrient Agar¹ Granulomatose Amoebic Encephalitis² Mannose Binding Protein

گرفت: جداسدن دو رشته هدف اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، جداسدن دو رشته هدف ۳۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال اختصاصی پرایمر به توالی هدف ۴۵ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد، طولیل‌شدن یک‌دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و طولیل‌شدن نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

۱۰ محصول PCR (از هر محل نمونه‌گیری، ۲ عدد بر حسب تصادف)، به شرکت پیشگام فرستاده شد و بعد از خالص‌سازی، توالی ژن، ارسال و پس از ویرایش با نرم افزار کروماس، با ژن‌های دیگر بر اساس آنالیز ناحیه DF3 در بانک اطلاعات ژنی بررسی و ژنوتایپ آنها مشخص گردید. در نهایت، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) استفاده شد.

یافته‌ها

از ۵۰ نمونه کشت داده‌شده بر روی محیط کشت آگار غیر مغذی، ۳۴ (۶۸ درصد) نمونه آب، آلوده به آمیب آکانتامبا بودند (جدول ۲).

جدول ۲- محل و تعداد نمونه‌گیری و موارد مثبت

محل نمونه‌گیری	تعداد کل	موارد مثبت	درصد
رودخانه	۱۸	۱۳	۷۲/۲۲
کانال کشاورزی	۱۴	۸	۵۷/۱۴
آب شیر	۱۰	۷	۷۰
استخر پارک	۵	۴	۸۰
استخر شنا	۳	۲	۶۶/۶۶
تعداد کل	۵۰	۳۴	۶۸

شناسایی، بر اساس دیدن کیست ستاره‌ای شکل صورت گرفت (شکل ۱).

آنالیز PCR بروی نمونه‌های مثبت، با استفاده از پرایمرهای JDP1 و JDP2 انجام و با مشاهده باند ۵۰۰bp بروی ژل آگارز، تأیید گردید (شکل ۲).

خراش، در سطح محیط پدیدار گردد. پلیت‌ها در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت یک تا دو هفته انکوبه شدند (۱۳).

کلونینگ (Cloning)

برای انجام این کار، قسمتی از محیط را که دارای بیشترین آمیب آکانتامبا و کمترین قارچ بود، برداشته و در محیط غیر مغذی دیگری قرار داده شد و تا زمان حذف قارچ‌ها از محیط، این کار ادامه یافت. وقتی فقط آمیب آکانتامبا در محیط باقی ماند و قارچ‌ها حذف شد، باکتری اشرشای کشته‌شده (به عنوان منبع غذایی انگل)، به محیط اضافه و محیط کشت‌ها، به مدت یک ماه، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا تعداد آمیب افزایش یابد؛ سپس زیر و روی محیط، با PBS استریل، شسته شد و کیست‌های آمیب، در لوله‌ای استریل جمع‌آوری و سانتریفیوژ و رسوب‌ها جمع‌آوری گردید.

استخراج DNA و انجام آنالیز مولکولی

استخراج DNA، با استفاده از روش فنل کلروفرم انجام گرفت (۱۶). DNA استخراج‌شده، به نسبت ۱:۵۰ با آب مقطر رقیق شد و مقدار جذب آن در طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر، به وسیله UV visible spectrophotometer به دست آمد؛ سپس برای تأیید شناسایی آکانتامبای جداسده از کشت، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، ناحیه‌ای از ژنوم آکانتامبا که زیرواحد کوچک RNA ریپوزومی را کد می‌کند، با پرایمر اختصاصی (جدول ۱) تکثیر گردید.

جدول ۱- ترادف زوج پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژنوم آکانتامبا

نام پرایمر	۳' به ۵' ترادف از	طول پرایمر جفت باز
JDP1	5'-GGCCCAGAT CGTTTACCGTGAA-3'	22
JDP2	5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3'	24

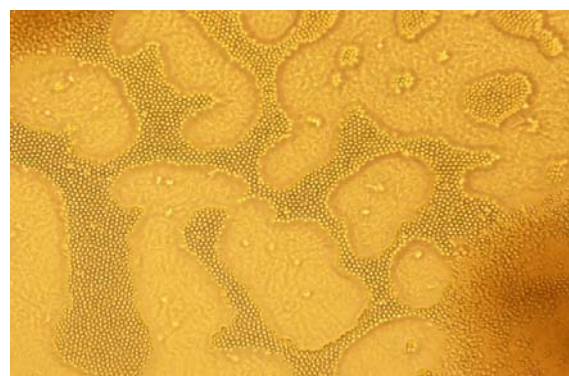
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم ۳۰ میکرولیتری، با استفاده از ترموسایکلر با برنامه زیر، در ۳۳ سیکل صورت

جدول ۳- شماره نمونه‌ها و شماره ثبت ژن‌ها در بانک ژن

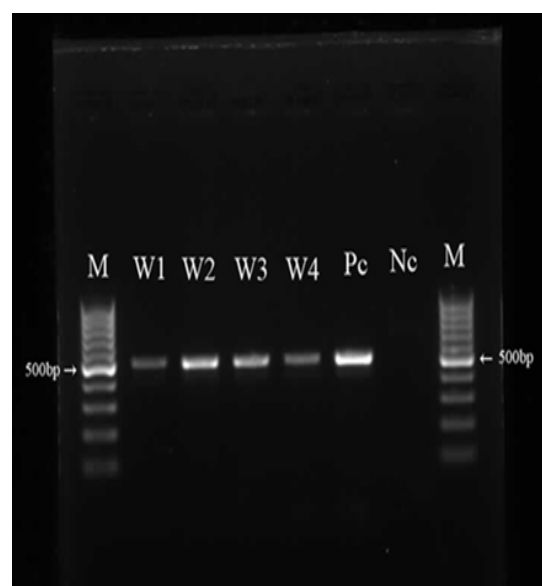
شماره	ژنوتایپ	شماره ثبت
W1	T4	KF038130
W2	T4	KF038131
W3	T4	KF038132
W4	T4	KF038133
W5	T4	KF038134
W6	T4	KF038135
W7	T4	KF038136
W8	T4	KF038137
W9	T4	KF038138
W10	T4	KF038139

بحث

این مطالعه، حضور و ژنوتایپ آمیب را در شهر بجنورد واقع در استان خراسان شمالی نشان می‌دهد. نمونه‌ها از جاهایی تهیه گردید که فعالیت روزمره مردم در آن مناطق کاملاً مشهود بود. ۶۸ درصد نمونه‌های آب‌های جاری در کانال کشاورزی، آب شیر، استخرهای شنا، استخر پارک‌ها و رودخانه‌ها، آلوده به آمیب آکانتامبا بودند. مطالعات قبلی در ایران، حضور این آمیب را در آب، خاک و گرد و خاک ثابت کردند (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر، محققین برای بررسی حضور این آمیب در آب شیر، از آب شیر بیمارستان‌های ایران نمونه‌برداری کردند (۱۵)؛ همچنین بر اساس روش کشت نشان دادند که بیشترین میزان آلودگی (۸۳٪) آب شیر، مربوط به بیمارستان‌های شهر مشهد است. وجود آمیب آکانتامبا در آب شیر بیمارستان‌ها، می‌تواند یک نقطه خطر برای بیماران بستری و پرسنل بیمارستان‌ها محسوب شود (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر، محققین، از بیوفیلم بیمارستان‌های شهر تهران که بیماران نقص سیستم ایمنی در آن بخش‌ها بستری بودند، آکانتامبا با ژنوتایپ T4 (ژنوتایپ بالقوه پاتوژن) را جدا کردند (۱۴). مطالعه‌ای دیگر که بر روی منابع آبی شهر اهواز انجام گرفته است، نشان داد که ۷۱/۶ درصد منابع آبی کانال کشاورزی، آب شیر و رودخانه‌ها، آلوده به آکانتامبا با ژنوتایپ T4 بوده است که این نتایج، با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۸). حضور بالای آمیب آکانتامبا در آب و دیگر منابع محیطی، یک خطر بهداشتی برای سلامت عمومی



شکل ۱- کیست ستاره شکل در محیط آگار غیر مغذی حاوی باکتری اشرشیا کشته شده. بزرگمایی ۴۰



شکل ۲- مشاهده باند ۵۰۰bp آکانتامبا بر روی ژل آگاروز

مارکر (M): Molecular weight marker (100bp)

Water: W

Negative control: Nc

Positive control: Pc

نتایج حاصل از توالی ژن^۱ نشان داد که ۱۰۰ درصد ژنوتایپ‌ها، مربوط به ژنوتایپ T4 می‌باشد؛ سپس شماره‌های ثبت ژن‌ها^۲، با نام‌های KF038130 تا KF038139 در بانک ژن ثبت گردید (جدول ۳).

¹ Sequencing

² accession numbers

وجود این آمیب در کانال کشاورزی، عامل تهدیدکننده سلامتی کشاورزان محسوب می‌گردد. حضور این آمیب در رودخانه‌ها، به علت اینکه مردم از طبیعت زیبای شهر بجنورد و رودخانه‌های اطراف آن برای گذراندن اوقات فراغت خود استفاده می‌کنند، نقطه خطر به حساب می‌آید. در این مطالعه، آمیب آکانتامبا، از استخرهای شنا جدا شده است. این آمیب می‌تواند برای افرادی که از استخرهای شنا استفاده می‌کنند، حائز اهمیت باشد. وجود آمیب آکانتامبا در آب حوض پارک‌ها به علت آب‌بازی کودکان با این آب‌های آلوده به‌ویژه در فصول گرم سال، برای سلامتی آنها نقطه خطر محسوب می‌شود که نتیجه این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر محققین همخوانی دارد (۱۸).

نتیجه‌گیری

از آنجایی که آمیب آکانتامبا در محیط اطراف ما وجود دارد و روزانه با این آمیب بدون اینکه خود متوجه باشیم، سروکار داریم، بر همین اساس رعایت نکات بهداشتی توصیه می‌گردد.

تقدیر و تشکر

از همه همکارانی که در انجام این تحقیق همکاری داشته‌اند، کمال سپاسگزاری را دارم.

افراد به‌ویژه برای بیماران دارای نقص سیستم ایمنی و کسانی که از لنز تماسی استفاده می‌کنند، محسوب می‌شود؛ علاوه بر این، آکانتامبا از بیماران مبتلا به کراتیت چشمی جدا می‌شود که بر اساس روش مولکولی مشخص شد که ژنوتایپ غالب، T4 می‌باشد (۵).

مطالعات نشان داده است که ژنوتایپ‌های T11، T2 و T4، عامل ایجاد کراتیت آمیبی و ژنوتایپ‌های T1، T4، T10 و T2، با بیماری آنسفالیت آمیبی مرتبط می‌باشد؛ همچنین ژنوتایپ غالب در نمونه‌های کلینیکی و محیطی، ژنوتایپ T4 است (۱۷، ۱۹، ۲۰). مطالعه ما نیز نشان داد که در منابع آبی شهر بجنورد، ژنوتایپ غالب، T4 می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر روی آب‌های سطحی شهر تهران بر اساس آنالیز مولکولی انجام شد، مشخص گردید که ۵۹/۱ درصد آب‌ها، آلوده به آکانتامبا است که این نتیجه با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۲۱).

بدیرزاده و همکاران، در تحقیقی که در آب گرم سرعین شهر اردبیل به روش مولکولی انجام دادند، نشان دادند که ۴۳ درصد آب‌های این مکان، آلوده به آمیب آکانتامبا با ژنوتایپ T4 و والکافیا است (۲۲).

وجود آکانتامبا در آب شیر می‌تواند برای همه افراد تهدیدکننده باشد، ولی این خطر آلودگی برای کسانی که لنز تماسی خود را آب شیر می‌شویند، بیشتر قابل توجه است.

منابع:

- 1- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. 2004; 34(9): 1001-27.
- 2- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30(4): 564-95.
- 3- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(2): 273-307.
- 4- Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DSC, et al. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(5): 1621-5.
- 5- Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2005; 54(Pt 8): 755-9.

- 6- Corsaro D, Venditti D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res.* 2010; 107(1): 233-8.
- 7- Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathog.* 2003; 34(6): 277-85.
- 8- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillari*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEM Immunol Med Microbiol.* 2007; 50: 1-26.
- 9- Niiyyati M, Rezaie S, Babaei Z, Rezaeian M. Molecular Identification and Sequencing of Mannose Binding Protein (MBP) Gene of *Acanthamoeba palestinensis*. *Iran J Parasitol.* 2010; 5(1): 1-5.
- 10- Barker J, Brown MR. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology.* 1994; 140 (Pt 6): 1253-9.
- 11- Horn M, Wagner M. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol.* 2004; 51(5): 509-14.
- 12- Rezaeian M, Niiyyati M. Pathogenic free-living amebas in human. 1st ed. Iran: Tehran University of Medical Sciences; 2009.
- 13- Rezaeian M, Niiyyati M, Farnia Sh, Motevalli Haghi A. Isolation of *Acanthamoeba* spp. from different environmental sources. *Iran J Parasitol.* 2008; 3(1): 44-7.
- 14- Lasjerdi Z, Niiyyati M, Haghighi A, Shahabi S, Biderouni FT, Taghipour N, et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. *Parasitol Res.* 2011; 109(3): 575-80.
- 15- Bagheri HR, Shafiei R, Shafiei F, Sajjadi SA. Isolation of *Acanthamoeba* spp. from Drinking Waters in Several Hospitals of Iran. *Iran J Parasitol.* 2010; 5(2): 19-25.
- 16- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
- 17- Niyati M, Lorenzo Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebbi M, Maghsoud AH, et al. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp Parasitol.* 2009; 121(3): 242-5.
- 18- Rahdar M, Niiyyati M, Salehi M, Feghhi M, Makvandi M, Pourmehdi M, Farnia S. Isolation and Genotyping of *Acanthamoeba* strains from Environmental Sources in Ahvaz City, Khuzestan Province, Southern Iran. *Iran J Parasitol.* 2012; 7(4): 22-6.
- 19- Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. *J clin microbiol.* 2010; 48(12): 4636-40.
- 20- Jeong HJ, Yu HS. The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean J Parasitol.* 2005; 43(2): 47-50.
- 21- Eftekhari M, Nazemalhosseini Mojarad E, Haghighi A, Sharifi Sarasiabi K, Nochi Z, Athari A. Detection of *Acanthamoeba* from fresh water using polymerase chain reaction. *Journal of The Faculty of Medicine.* 2009; 33(1): 43-6. [Persian]
- 22- Badirzadeh M, Niiyyati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Rezaeian M. Isolation of Free-Living Amoebae from Sarein Hot Springs in Ardebil Province, Iran. *Iran J Parasitol.* 2011; 6(2): 1-8.

Abstract

Short Communication

Acanthamoeba Strains genotypes prevalence in water Sources in Bojnurd City

Mitra Salehi¹

Background and Aim: *Acanthamoeba* is a free-living amoebae commonly found in the environmental sources such as soil, water, and dust. This parasite is the causative agent of amoebic keratitis (AK). The objective of the present study was to investigate the presence of *Acanthamoeba* genotypes in water sources in Bojnurd City.

Materials and Methods: Totally, 50 samples of water were taken from different localities of Bojnurd including agricultural canals, rivers, and swimming pools. Filtration and cultivation were carried out on non-nutrient agar medium (NNA). PCR analysis was conducted on positive samples. Sequencing was done for 10 PCR products. Genotypes were identified by means of Blast search and homology analysis. The obtained data was analyzed using SPSS software (V: 16).

Results: *Acanthamoeba* amoebae was found in 34 (68%) samples of the water. Genotyping of 10 samples proved to be T4 (100%) genotype.

Conclusion: While *Acanthamoeba* amoebae is found in our surrounding environment which unknowingly contaminates us every day. Thus, to prevent the contamination, hygiene consideration is recommended.

Key Words: *Acanthamoeba* spp; Water; Bojnurd city

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (2): 260-266.

Received: September 16, 2013

Accepted: December 30, 2013

¹ Assistant professor, North Khorasan, Bojnourd Amam Ali Hospital

misssalehi@yahoo.com