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

میترا صالحی[1]

چکیده

زمینه و هدف: آمیب آکانتامبا، آمیب آزادزی است که در طبیعت، به‌طور وسیع در منابع محیطی مانند: خاک، آب و گرد وخاک 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 استخر شنای شهر بجنورد جمع‌آوری گردید. فیلتراسیون و کشت، برروی محیط آگار غیر مغذّی 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، متعلّق 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

[1] 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 آزادزی است که در طبیعت به‌طور وسیع در منابع محیطی مانند: خاک، آب و گرد و خاک یافت می‌شود (۱-۴). فرم کیست این آمیب، می‌تواند سال‌ها در محیط باقی بماند و به حیات خود ادامه دهد. این آمیب را بر اساس سکانس ژن rRNA، به ۱۷ ژنوتایپ (T1-T17) طبقه‌بندی کرده‌اند؛ همچنین توانسته‌اند این آمیب را از نازوفارنکس و پوست جدا نمایند (۵، ۶).

انسان به‌طور دائم در تماس با آمیب آکانتامبا قرار دارد. راه‌های ورود آمیب آکانتامبا به بدن انسان متفاوت است؛ از راه پوست آسیب‌دیده که در تماس با انگل می‌باشد، یا از طریق مجاری تنفسی، به‌صورت کیست موجود در هوا یا باد، وارد بدن می‌شود و از طریق دستگاه گردش خون، خود را به سیستم عصبی و اندام‌های دیگر می‌رساند (۱، ۲)

آمیب آکانتامبا دو نوع آلودگی می‌دهد: در افراد با نقص سیستم ایمنی و ایدزی، عامل گرانولوماتوز آنسفالیت آمیبی (GAE)[1] است؛ نوع دیگر آلودگی با این آمیب، کراتیت آمیبی است که ممکن است در افراد سالم به‌وجود آید. لنزهای تماسی، اصلی‌ترین عامل خطر در ایجاد کراتیت آمیبی می‌باشد. علائم کراتیت آمیبی شامل: درد شدید چشم، ترس از نور و التهاب حلقوی قرنیه است. اولین مرحله در بیماری‌زائی آکانتامبا، چسبیدن به سطح سلول است. مطالعات نشان داده است که در سطح آمیب، گیرنده‌هایی پروتئینی به‌نامMBP[2] با وزن ۱۳۶ کیلودالتون وجود دارد که به گلیکوپروتئین‌های حاوی مانوز در سطح سلول‌های هدف متصل می‌شود (۱، ۳، ۷-۹).

کراتیت آمیبی نیز ممکن است به‌علت استفاده از آب غیر استریل و یا شنا در استخرهای آلوده رخ دهد. آکانتامبا، می‌تواند قارچ‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌هایی مانند: لژیونلا و مایکوباکتریوم را حمل کرده و وارد بدن میزبان کند و موجب بیماری‌زایی و علائم دیگر شود (۱۰، ۱۱).

در ایران، رضاییان و باقری، اولین مورد کراتیت آمیبی را به‌وسیله روش‌های کشت، تأیید کردند (۱۲). در سال‌های اخیر، کراتیت آمیبی در ایران و جهان به‌علت 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). محقّقین، آکانتامبا با ژنوتایپ T4 را از بیوفیلم[3] بخش‌های بیمارستان‌های تهران جدا کرده‌اند (۱۴)؛ همچنین آکانتامبا، از آب شیر بیمارستان‌های ایران جدا شده است (۱۵).

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

روش تحقیق

نمونه‌گیری

این مطالعه توصیفی، از دی‌ماه 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. نمونه‌ها به‌روش نمونه‌گیری طبقه‌ای، متناسب با حجم طبقه، از رودخانه‌ها ۱۸ نمونه، کانال‌های کشاورزی ۱۴ نمونه، آب شیر ۱۰ نمونه، استخر پارک‌ها ۵ نمونه و استخرهای شنا ۳ نمونه، به حجم ۵۰۰-۱۰۰ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد.

کشت

تقریباً ۵۰۰ میلی‌لیتر آب، با فیلتر نیترات‌سلولز با منافذ ۰/۴۵میکرون، فیلتر گردید. برای کشت Monoxenic، فیلتر مرحله قبل بر روی آگار غیر مغذّی[4] 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 می‌کند، از راه

[1] *Granulomatose Amoebic Encephalitis*
[2] *Mannose Binding Protein*
[3] *Biofilm*
[4] *NNA Non Nutrient Agar*

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

کلونینگ (Cloning)

برای انجام این‌کار، قسمتی از محیط را که دارای بیشترین آمیب آکانتامبا و کمترین قارچ بود، برداشته و در محیط غیر مغذّی 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 اشرشیای کشته‌شده (به‌عنوان منبع غذایی انگل)، به محیط اضافه و محیط کشت‌ها، به‌مدت 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 فنل‌کلروفرم 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، به‌وسیله UV visible spectrophotometer به‌دست آمد؛ سپس برای تأیید شناسایی آکانتامبای جداشده از کشت، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، ناحیه‌ای از ژنوم آکانتامبا که زیرواحد کوچک RNA ریبوزومی را کد می‌کند، با پرایمر اختصاصی (جدول ۱) تکثیر گردید.

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

نام پرایمر	ترادف از 5′به3′	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 گرفت: جداشدن دو رشته هدف اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، جداشدن دو رشته هدف ۳۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال اختصاصی پرایمر به توالی هدف ۴۵ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد، طویل‌شدن یک‌دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و طویل‌شدن 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

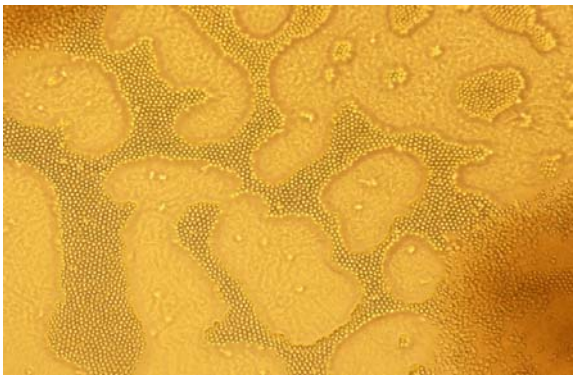
از ۵۰ نمونه کشت داده‌شده بر روی محیط کشت آگار غیر مغذّی، ۳۴ (۶۸ درصد) نمونه آب، آلوده به آمیب آکانتامبا بودند (جدول ۲).

جدول ۲- محل و تعداد نمونه‌گیری و موارد مثبت

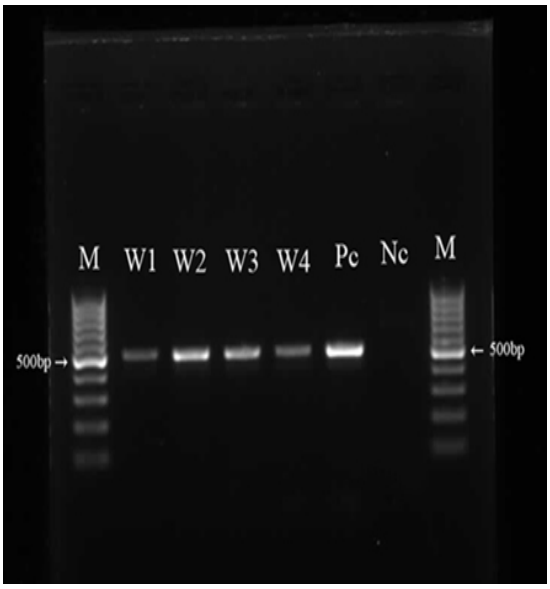
محل نمونه‌گیری	تعداد کل	موارد مثبت	درصد
رودخانه	۱۸	۱۳	۷۲/۲۲
کانال کشاورزی	۱۴	۸	۵۷/۱۴
آب شیر	۱۰	۷	۷۰
استخر پارک	۵	۴	۸۰
استخر شنا	۳	۲	۶۶/۶۶
تعداد کل	۵۰	۳۴	۶۸

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

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



شکل ۱-کیست ستاره شکل در محیط آگار غیر مغذّی حاوی باکتری اشرشیای کشته‌شده. بزرگنمایی ۴۰



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

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

W: Water

Nc: Negative control

Pc: Positive control

نتایج حاصل از توالی ژن[1] نشان داد که ۱۰۰درصد ژنوتایپ‌ها، مربوط به ژنوتایپ T4 می‌باشد؛ سپس شماره‌های ثبت ژن‌ها[2]، با نام‌های KF038130 تا KF038139 در بانک ژن ثبت گردید (جدول ۳).

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 روزمرّه مردم در آن مناطق کاملاً مشهود بود. ۶۸درصد 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 اکانتامبا 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 بالقوّه پاتوژن) را جدا کردند (۱۴). مطالعه‌ای دیگر که بر روی منابع آبی شهر اهواز انجام گرفته است، نشان داد که ۷۱/۶درصد 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

[1] *Sequencing*
[2] *accession numbers*

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 T۴، عامل ایجاد کراتیت آمیبی و ژنوتایپ‌های T۱، T۴، T۱۰ و T۲، با بیماری آنسفالیت آمیبی مرتبط می‌باشد؛ همچنین ژنوتایپ غالب در نمونه‌های کلینیکی و محیطی، ژنوتایپ T۴ 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 ۴۳درصد 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. 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 به‌علت 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.

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- Niyyati 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, Niyyati M. Pathogenic free-living amebas in human. 1st ed. Iran: Tehran University of Medical Sciences; 2009.

13- Rezaeian M, Niyyati 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, Niyyati 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, Fristsch 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, Mohebali 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, Niyyati 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- Eftekhar 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 Medicin. 2009; 33(1): 43-6. [Persian]

22- Badirzadeh M, Niyyati 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 Salehi[1]

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*