

ارزیابی اعتبار تشخیصی تست سرولوژی رایت در بیماری بروسلاوز

دکتر محسن سیدنوزادی^۱- دکتر مجیدرضا عرفانیان تقوایی^۲

چکیده

زمینه و هدف: بیماری بروسلاوز یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک انسان و دام می‌باشد که انتشار گسترده جهانی داشته و در بسیاری از نقاط ایران نیز به صورت بومی وجود دارد. با توجه به این که عفونت بروسلاوی دارای عالم بالینی متنوع و گمراه‌کننده است، روش‌های آزمایشگاهی ساده، ارزان و مطمئن در شناسایی عفونت‌های بروسلاوی کمک شایانی می‌نماید. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اعتبار تست سرولوژی رایج مورد استفاده در تشخیص این بیماری (تست رایت) انجام شد.

روشن تحقیق: در این مطالعه، ۳۴۰ بیمار مبتلا به بروسلاوز از بین بسترهای شدگان بخش عفونی به صورت تصادفی انتخاب شدند و آزمایش سرولوژی رایت آنان مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت تست رایت یک بار بر مبنای تیتر ۱/۱۶۰ و بار دیگر بر اساس تیتر ۱/۸۰ محاسبه گردید. برای محاسبه ویژگی تست رایت، ۱۶۰ نفر از بیماران غیر بروسلاوزی که برای آنها آزمایش رایت درخواست شده بود (گروه شاهد)، انتخاب شدند و ویژگی تست رایت نیز بر اساس تیتر ۱/۱۶۰ و ۱/۸۰ محاسبه گردید.

یافته‌ها: بیماران مبتلا به بروسلاوز $\frac{۵۳}{۸}$ % مذکر و $\frac{۴۶}{۲}$ % مؤنث و غیرمبتلایان به بیماری $\frac{۵۲}{۷}$ % مذکر و $\frac{۴۷}{۳}$ % مؤنث بودند. حساسیت تست رایت بر مبنای تیتر ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ به ترتیب $\frac{۹۱}{۸}$ % و $\frac{۸۰}{۶}$ % به دست آمد. ویژگی تست رایت بر اساس تیتر ۱/۸۰ و $\frac{۹۷}{۵}$ % به ترتیب $\frac{۱۰۰}{۱۱۶}$ % به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان اذعان داشت که تست رایت که به طور رایج در بررسی‌های همه‌گیر شناختی و تشخیصی مورد استفاده قرار می‌گیرد، دارای اعتبار قابل توجهی است و می‌تواند هنوز هم به عنوان تست غربالگری اولیه با تیتر ۱/۸۰ و تست تشخیصی با تیتر ۱/۱۶۰ مورد استفاده قرار گیرد. بدیهی است برای تشخیص قطعی سایر تست‌ها و در صورت ضرورت، کشت می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بروسلاوز؛ تست سرولوژی رایت؛ اعتبار؛ حساسیت؛ ویژگی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیر جند. ۱۶: ۱۳۸۸-۲۸-۳۲

دریافت: ۱۳۸۶/۸/۹ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۳/۲۸ پذیرش: ۱۳۸۷/۶/۲۶

^۱ نویسنده مسؤول؛ استاد گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
آدرس: مشهد- بیمارستان قائم (عج)- بخش پزشکی اجتماعی و بهداشت

تلفن: ۰۵۱۱-۸۴۰۴۹۴. پست الکترونیکی: m_snozadi@yahoo.com

^۲ دانشیار گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

جمعیت) (۹). میزان بروز بیماری در ایران ۱۳/۲ مورد در صدهزار می‌باشد (۱۰).

با توجه به این که عفونت بروسلایی دارای علائم بالینی متنوع و گمراه‌کننده بوده و در بعضی موارد شبیه بیماری‌های دیگر می‌باشد، دسترسی به روش‌های آزمایشگاهی ارزان، مطمئن، ساده و در عین حال قابل تکرار در تشخیص افتراقی و درمان بیماری کمک شایانی می‌نماید.

تست‌های آگلوتیناسیون موجود که در تشخیص این بیماری انجام می‌شود، دارای ویژگی‌های مذکور می‌باشند. با وجود روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی متعددی که جهت شناسایی آنتی‌زن بروسلا در سرم انسان وجود دارد، تست رایت هنوز به عنوان رایج‌ترین تست برای غربالگری^۱ و تشخیص بیماری به کار می‌رود ولی باید اذعان کرد با وجود روش‌های تشخیصی مختلف، هنوز هم در مورد اعتبار این روش‌ها نتایج متناقض و گمراه‌کننده‌ای ارائه می‌گردد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی آزمایش مذکور با توجه به وضعیت بیماری در کشور و امکانات آزمایشگاهی موجود و معیارهایی که برای تشخیص بیماری به کار می‌رود و در جهت کمک به تصمیم‌گیری‌های بالینی انجام شد.

روش تحقیق

در این مطالعه به منظور ارزیابی اعتبار تست رایت در غربالگری بروسلوز، ۳۴۰ بیمار با تشخیص قطعی بروسلوز (بر مبنای علائم بالینی، آزمایشگاهی و پاسخ به درمان) از بین بستری شدگان بخش عفونی بیمارستان شهید هاشمی نژاد مشهد به صورت تصادفی انتخاب شدند و آزمایش سروولژی رایت آنها مورد بررسی قرار گرفت و حساسیت این تست محاسبه گردید. در مرحله اول معیار مثبت‌بودن برای تست رایت، تیتر ۱/۱۶۰ و در مرحله دوم تیتر ۱/۸۰ مبنای محاسبه و مقایسه حساسیت و ویژگی قرار گرفت.

برای محاسبه ویژگی تست رایت به عنوان گروه شاهد،

بروسلوز یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد که انتشار گستره‌دار جهانی دارد و بیماری‌ای آن در گونه‌های مختلف حیوانی شبیه به هم می‌باشد (۱). این بیماری از طریق مصرف محصولات لبنی آلوده مثل شیر و پنیر یا تماس با گوشت، مدفوع و ادرار حیوان آلوده به انسان منتقل می‌گردد (۲). شیر خام، محصولات لبنی غیر پاستوریزه، پنیر تازه و گوشت و احشای آلوده دام منابع شایع می‌باشد. گاهی انتقال ارگانیسم از طریق استنشاق هوای آلوده مسیر عبور گله‌ها نیز صورت می‌گیرد؛ چون باکتری به مدت ۷۲ روز در خاک مرطوب زنده می‌ماند (۱).

بروسلوز یک بیماری عفونی عمومی است که عامل آن باسیل‌های گرم منفی از جنس بروسلا می‌باشد که دارای گونه‌های عمدۀ ملی‌تنسیس^۱، آبورتوس^۲، سوئیس^۳ و کانیس^۴ می‌باشد (۳،۴). به دلیل ماهیت علائم بالینی غیر واضح، موارد تشخیص داده‌نشده آن را تا چندین برابر اطلاعات منتشرشده، تخمین می‌زنند (۱).

اگرچه بیماری بروسلوز در کشورهای توسعه‌یافته تحت کنترل درآمده است، اما شیوع آن در کشورهای در حال توسعه رو به فزونی است؛ به طوری که سالانه بیش از پانصد هزار مورد به ثبت می‌رسد (۴). این بیماری در کشورهای در حال توسعه به عنوان یک مشکل بهداشتی مطرح است (۵).

شیوع بیماری در مناطق مدیترانه، مکزیک، مناطق جنوبی و مرکزی آمریکا بالا می‌باشد (۷/۶)؛ به علاوه در کشورهایی مثل ترکیه، عربستان سعودی، سوریه، اردن و ایران شیوع بالای داشته و نیز در بعضی از کشورهای منطقه مدیترانه و ایران، به صورت بومی وجود دارد (۸/۵)؛ به نحوی که در طول سال‌های ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۹، هر ساله ۹ هزار مورد جدید در ترکیه گزارش شده است (میزان بروز ۱۴ در صد هزار نفر

^۱*B. Melitensis*^۲*B. Abortus*^۳*B. Suis*^۴*B. Canis*

جدول ۳- فراوانی مطلق و نسبی غیر مبتلایان به تفکیک
نتیجه آزمون رایت (بر اساس تیتر ۱/۱۶۰)

درصد	تعداد	نتیجه آزمون رایت
۱۰۰	۱۶۰	منفی
.	.	مثبت
۱۰۰	۱۶۰	جمع

بیماران غیر مبتلا به بیماری بروسلوز که با تشخیص‌های دیگری غیر از بروسلوز برای آنها آزمایش رایت درخواست شده بود، انتخاب شدند (۱۶۰ نفر).

پس از استخراج اطلاعات و تشکیل جداول مربوطه حساسیت و ویژگی تست رایت با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵) محاسبه گردید.

بحث

یافته‌ها

چون بروسلوز دارای علائم بالینی واضح و مشخص نبوده، روش‌های آزمایشگاهی ارزان و معتبر ارزش و اهمیت زیادی دارد. تست‌های رایت و رزبنگال^۱ دارای ویژگی‌های مذکور می‌باشد. نتایج مطالعات مقایسه‌ای انجام شده در مورد این تست‌ها گویای نظر فوق می‌باشد (۱۲، ۱۱).

به طور معمول و روزمره، تشخیص بروسلوز بر مبنای تیتر مساوی یا بیش از ۱/۱۶۰ به روش رایت می‌باشد؛ مشروط به این که فرد علائم بالینی بیماری را داشته باشد؛ تشخیص قطعی بر اساس کشت خون یا مغز استخوان می‌باشد که نتایج کشت بسته به گونه باکتری، دوره بیماری، روش آزمایش و مصرف یا عدم مصرف دارو متغیر خواهد بود.

تاکنون کشت گونه‌های مختلف بروسلوز در محیط کشت کاستاندا^۲ انجام می‌شد که گرچه وقت‌گیر است ولی رضایت‌بخش بوده است (۱۳). امروزه روش‌های جدیدتر کشت هم مطرح است که ما در اختیار نداریم. با روش‌های کشت خون با استفاده از فناوری جدید، سرعت رشد باکتری نسبتاً افزایش یافته و مدت زمان نگهداری نیز تا هفت روز کاهش داده شده است (کشت در محیط کاستاندا را تا چهارده روز باید نگه داشت). توان تشخیصی روش‌های جدید ۹۰٪ می‌باشد (۱۴، ۸، ۱۵)؛ با این حال، تفکیک گونه باکتری به دلیل ایجاد کلی در کشت باکتری مشکل و وقت‌گیر می‌باشد. بررسی‌های مختلف نشان داده است که در تمام مواردی که نتیجه کشت

بیماران مبتلا به بروسلوز ۵۳/۸٪ مذکر و ۴۶/۲٪ مؤنث و غیر مبتلایان به بروسلوز ۵۲/۷٪ مذکر و ۴۷/۳٪ مؤنث بودند. از مجموع آزمون‌های رایت مربوط به بیماران مبتلا به بروسلوز، ۸/۲٪ کمتر از ۱/۸۰ و ۱۱/۲٪ برابر ۱/۸۰ و ۸۰/۶٪ مساوی یا بیشتر از ۱/۱۶۰ بود (جدول ۱) که حساسیت تست رایت بر مبنای تیتر ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ و به ترتیب برابر ۹۱/۸٪ و ۸۰/۶٪ محاسبه گردید.

آزمون رایت در افراد غیر مبتلا (گروه شاهد) ۹۷/۵٪ بر اساس تیتر ۱/۸۰ منفی و ۲/۵٪ مثبت بود که ویژگی آن ۹۷/۵٪ می‌شود. تمامی افراد گروه شاهد بر اساس تیتر ۱/۱۶۰ نتیجه آزمون منفی داشتند که بر این اساس، ویژگی تست ۱۰۰٪ می‌باشد (جدول ۲ و ۳).

جدول ۱- فراوانی مطلق و نسبی بیماران مبتلا به بروسلوز بر حسب تیتر آزمون رایت

تیتر آزمون رایت	درصد	تعداد
۱/۸۰<	۸/۲	۳
۱/۸۰	۱۱/۲	۳۸
۱/۱۶۰≥	۸۰/۶	۲۷۴
جمع	۱۰۰	۳۴۰

جدول ۲- فراوانی مطلق و نسبی غیر مبتلایان به تفکیک نتیجه آزمون رایت (بر اساس تیتر ۱/۸۰)

نتیجه آزمون رایت	درصد	تعداد
منفی	۹۷/۵	۱۵۶
مثبت	۲/۵	۴
جمع	۱۰۰	۱۶۰

ثبت و منفی تست رایت به ترتیب 100% و $99/7\%$ خواهد شد؛ ولی در مورد تست الیزا IgG به ترتیب $45/2\%$ و $79/1\%$ و الیزا IgM 100% و $89/9\%$ و ترکیبی از الیزاها به ترتیب 63% و $99/6\%$ خواهد بود (۹).

بر اساس نتایج این مطالعه، بیمارانی که دارای بروسلوز فعال بودند، حساسیت تست الیزای IgG و IgM نزدیک به تست رایت بود؛ بنابراین انجام آزمایشات ترکیبی الیزای IgG و IgM مشابه رایت خواهد بود و ارزش پیشگویی مثبت تست رایت و الیزای IgM رضایت‌بخش می‌باشد (۱۸).

باید توجه داشت در صورتی که عفونت با گونه بروسلakanیس باشد، چون از آنتیژن‌های سایر بروسلaha استفاده می‌شود و آنتی‌بادی‌ها ناقص می‌باشند، بررسی آنتی‌بادی در هر دو روش رایت و الیزا منفی خواهد بود (۱۶).

در مطالعه حاضر، حساسیت و ویژگی تست رایت با رقت $1/160$ به ترتیب $80/6\%$ و 100% بود که مشابه مطالعه انجام‌شده در ترکیه می‌باشد (۱۵) ولی حساسیت تست رایت در مطالعه انجام‌شده در عربستان بیشتر گزارش شده است (۲۰، ۱۹)؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در کشورهایی که عمدۀ موارد عامل بروسلوز گونه‌های غیر از کانیس می‌باشند، تست رایت با رقت $1/80$ ، که با توجه به نتایج به دست آمده دارای حساسیت بالا می‌باشد، به عنوان تست معمول غربالگری پذیرفته شود، به شرط آن که از آنتی‌ژن استاندارد استفاده شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، حساسیت و ویژگی آزمون رایت بر اساس تیتر $1/80$ به ترتیب 92% و $97/5\%$ بوده و بر اساس تیتر $1/160$ به ترتیب $80/6\%$ و 100% می‌باشد. گرچه ویژگی به دست آمده برای آزمون رایت بر اساس تیتر $1/160$ که معیار پیشنهادی کتب مرجع برای تشخیص بیماران بروسلوزی است، بالا می‌باشد ولی به علت حساسیت نسبتاً

ثبت گزارش شده، تست‌های تشخیصی رزنگال و رایت نیز مثبت بوده‌اند. (در این موارد تست رایت مساوی یا بیشتر از $1/160$ تشخیصی تلقی شده است). اگر چه واکنش متقاطع بین عامل بروسلوز و عوامل وبا، فرانسیسلا^۱ و یرسینیا^۲ وجود دارد ($17, 16, 9$)؛ ولی در کشور ما چون معمولاً همه‌گیری این باکتری‌ها وجود ندارد، مشکلی ایجاد نمی‌کند. گرچه گاهی ممکن است عوامل شبه وبا در بعضی مناطق که همه‌گیری آن مطرح است، باعث تداخل شود که باید مورد توجه قرار گیرد. تیترهای پایین‌تر از $1/160$ هم به شرط این که افزاینده باشند، با ارزش خواهد شد. گاهی هم دیده شده است در افرادی که سل فعال دارند، تیتر آنتی‌بادی ضد بروسلوز آنها مساوی یا بیش از $1/160$ است که با علائم بالینی منطبق نمی‌باشد (۱۷). تست‌های تشخیصی حساس‌تر هم وجود دارد اما تست‌های رایت و ^۳2ME به حد کافی برای تشخیص بروسلوز رضایت‌بخش می‌باشند (۱۷, ۷, ۶).

در یک مطالعه مقایسه‌ای که در مورد ارزش تست رایت با تیتر $1/160$ ، الیزای IgM و IgG در مورد 184 بیمار تأیید شده در ترکیه انجام شد، میزان مثبت بودن تست‌ها به ترتیب $83/7\%$ ، $61/9\%$ و $49/5\%$ بود (۱۵)؛ در حالی که میزان مثبت شدن رزنگال در مورد بروسللا ملی‌تنسیس و آبورتوس به ترتیب 25% و 30% بود (۱۳)؛ بنابراین تست رزنگال و الیزا حساسیت کمتری نسبت به تست رایت دارند؛ بررسی دیگری که بر روی 68 بیمار با 70 فرد سالم به عنوان شاهد در عربستان سعودی برای مقایسه تست سرولوژی استاندارد و الیزا انجام شد، نشان داد که حساسیت و ویژگی تست‌های استاندارد به ترتیب $95/6\%$ و 100% بود؛ در مقابل در مورد تست الیزای IgG $45/6\%$ و $97/1\%$ و در مورد الیزای IgM $79/1\%$ و 100% بود (۹).

چنانچه فرض کنیم شیوع بروسلوز فعال در عربستان با در نظر گفتن تیتر بالای $1/320$ تست رایت، 5% باشد، پیشگویی

¹Francisella
²Yersinia

³2-Mercaptoethanol

تقدیر و تشکر

نویسنده‌گان مقاله از مسؤولین و کارکنان محترم بخش عفونی بیمارستان امام رضا (ع) مشهد که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

پایین آن، بهتر است تیتر ۱/۸۰ به عنوان تیتر پایه جهت غربالگری بیماران در نظر گرفته شود. بدیهی است سایر روش‌های تشخیصی می‌توانند در موارد محدودی که این تست‌ها جهت تشخیص قطعیت ندارند، به تایید تشخیص نهایی کمک نمایند.

منابع:

- 1- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Zinsser Microbiology. 20th ed. USA: Appleton & Lange; 1992.
- 2- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. USA: McGraw-Hill Medical; 2004.
- 3- Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sánchez-De-Mora D, Delgado M, Causse M, et al. Complications associated with Brucella melitensis infection: a study of 530 cases. Medicine (Baltimore). 1996; 75(4): 195-211.
- 4- Murray P R, Rosenthal KS. Medical Microbiology. 4th ed. London: Mosby; 2002. pp: 313-315.
- 15- Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol. 2002; 90(1-4): 81-110.
- 6- Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. J Clin Microbiol. 1999; 37(11): 3437-3442.
- 7- Young EJ. Brucella species. In: Mandell G.L, Bennett J.E, Dolin R. (Eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone; 2000. pp: 2386-2393.
- 8- Ruiz J, Lorente I, Perez J, Simarro E, Martinez-Campos L. Diagnosis of brucellosis by using blood cultures. J Clin Microbiol. 1997; 35(3): 2417-2418.
- 9- Mert A, Ozaras R, Tabak F, Bilir M, Yilmaz M, Kurt C, et al. The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 46(4): 241-3.
- 10- Rust RS. Brucellosis. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1164632-overview>.
- 11- Sharifi-mood B, Metanat M, Alavi-Naini R. Screening of the family members with acute brucellosis in south east of Iran. Indian J Microbiol. 2007; 25(2): 176-77.
- 12- Altwegg M, Bohl E. Evaluation of a rapid, reliable, and inexpensive screening test for the serological diagnosis of human brucellosis. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. 1985; 260(1): 65-70.
- 13- Gómez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escrivano MA, Muñoz A, et al. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(6): 1031-1033.
- 14- Gotuzzo E, Carillo C, Guerra J, Llosa L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis-the value of bone marrow culture. J Infect Dis. 1986; 153(1): 122-125.
- 15- Barron E.J, Fingold S.M. Bailey & Scott's Diagn Microbiol. 8th ed. London: Mosby; 1990. pp: 208-209.
- 16- Sirmatel F, Türker M, Bozkurt AI. [Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis of brucellosis]. Mikrobiyol Bul. 2002; 36(2): 161-7. [Turkish]
- 17- Mert A, Ozaras R, Tabak F, Bilir M, Yilmaz M, Kurt C, et al. The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 46(4): 241-3.
- 18- Raptis L, Pappas G, Akritidis N. A cutaneous cyst caused by brucellosis with a negative serological test. Int J Infect Dis. 2007; 11(1): 82-83.
- 19- Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. Rev Infect Dis. 1991; 13(3): 359-372.
- 20- Memish ZA, Almuneefm M, Mah MW, Qassem LA, Osoba AO. Comparison of Brucella standard agglutination test with the ELISA, IgG and IgM in patients with Brucella bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 44(2): 129- 132.

Evaluation of diagnostic validity of Wright's serologic test in Brucellosis

M. Seyednozadi¹, MR. Erfanian²

Background and Aim: Brucellosis is one of the most important worldwide zoonoses, which is endemic in many areas of Iran. As clinical findings are various and confusing in brucellosis; simple, inexpensive and valid laboratory tests would be helpful to diagnose the infection. This study aimed to evaluate the validity of Standard common serological test (Wright's) in the diagnosis of brucellosis.

Materials and Methods: In this study, 340 patients with diagnosis of brucellosis were randomly selected from admitted patients in infectious disease ward, and Wright's serologic test was studied. The sensitivity of Wright's test was calculated according to the basis of 1/160 and 1/80 titers. For calculating the specificity of this test according to the basis of 1/160 and 1/80 titers, 160 non-brucellosis patients with Wright's test results were selected as a control group.

Results: Out of 340 patients, 53.8% were male and 46.2% were female and from 160 controls, 52.7% were male and 47.3% were female. The sensitivity of Wright's test was 91.8% and 80.6% based on 1/80 and 1/160 titers, respectively. The specificity of Wright's test was 97.5% and 100% based on 1/80 and 1/160 titers, respectively.

Conclusion: According to the obtained results, it should be stated that Wright's test, which commonly is used in epidemiologic and diagnostic studies, has a significant validity and still can be used as a screening test based on 1/80 and as a diagnostic test based on 1/160 titer. It is obvious that other laboratory tests and if necessary, culture, may be used for definite diagnosis.

Key Words: Brucellosis; Wright's Serologic test; Validity; Sensitivity; Specificity

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2009; 16 (3):28-32

Received: 31.10.2007 Last Revised: 17.6.2008 Accepted: 16.9.2008

¹ Corresponding Author; Professor, Department of Community Medicine; Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences. Mashhad, Iran m_snozadi@yahoo.com

² Associate Professor, Department of Community Medicine; Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences. Mashhad, Iran