مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۷۵/هفته اول فروردین ماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۵

تشخیص و جداسازی عامل لیشمانیوز جلدی در اصفهان با روش ITS-PCR

فائزه محمدی[۱]، منیژه نریمانی[۲]، شهرام نکوئیان[۳]، لیلا شیرانی بیدآبادی[۴]، فریده محمدی[۵]، دکتر سید محسن حسینی[۶]، دکتر سید حسین حجازی[۷]

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز جلدی، بیماری انگلی است که به عنوان یک مشکل بهداشتی در بخش‌هایی از ایران به ویژه در استان اصفهان محسوب می‌شود. به علت تشابهات فنوتیپی اغلب گونه‌های Leishmania و مخازن متفاوت بیماری در دو شکل خشک و مرطوب، تعیین گونه‌ی انگل لازم می‌باشد. در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) گونه‌های انگل عامل لیشمانیازیس مشخص شد.

روش‌ها: از ۶۰ مورد مشکوک به لیشمانیوز جلدی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، بیمارانی که آزمایش مستقیم جلدی آن‌ها پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا، از نظر بیماری لیشمانیوز مثبت شده بود، انتخاب شدند و پس از تهیه‌ی کشت و استخراج DNA به روش ITS-PCR (Internal transcribed spacers-polymerase chain reaction) گونه‌ی عامل بیماری تعیین گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه با استفاده از روش ITS-PCR، ۶۰ ایزوله مورد بررسی قرار گرفت و گونه‌ی غالب L.major گزارش شد.

نتیجه‌گیری: تمام گونه‌های انگل از نظر مورفولوژیکی یکسان می‌باشند و تشخیص گونه‌ها به روش‌های پارازیتولوژی (میکروسکوپی و کشت) امکان‌پذیر نیست. با توجه به این که اصفهان یکی از کانون‌های آندمیک بیماری لیشمانیوز جلدی است، بنابراین جهت مبارزه با مخازن، پیش‌گیری و درمان بیماری، شناسایی گونه‌های انگل از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد.

واژگان کلیدی: لیشمانیوز جلدی، لیشمانیا ماژور

مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری انگلی است که در اغلب نقاط جهان به خصوص مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع می‌باشد و به عنوان یکی از معضلات بهداشتی ایران و بیش از ۸۰ کشور جهان محسوب می‌گردد (۱). در حال حاضر بیش از ۱۲ میلیون نفر در جهان به این بیماری آلوده هستند و در حدود ۳۵۰ میلیون نفر هم در معرض ابتلا به انواع مختلف این بیماری می‌باشند. لیشمانیوز در بیش از نیمی از استان‌های کشور ایران وجود دارد و سالیانه بیش از ۲۰ هزار نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند. بر اساس تحقیقات موجود میزان بروز واقعی این بیماری بیش از میزان گزارش شده، تخمین زده می شود (۲). این بیماری به سه شکل جلدی، احشایی و جلدی مخاطی قابل مشاهده است. عامل بیماری، یک انگل تک‌یاخته‌ای از جنس Leishmania است که توسط نیش پشه‌های

[۱] کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] کارشناس ارشد، آزمایشگاه مرکزی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] کارشناس ارشد، بخش سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، تهران، ایران
[۶] دانشیار، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۷] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین حجازی
Email: hejazi@med.mui.ac.ir

خاکی زیر خانواده‌ی فلبوتومینه از جنس Phlebotomus به انسان منتقل می‌شود (۳). در ایران این بیماری به دو شکل لیشمانیوز جلدی مرطوب ناشی از Leishmania major و لیشمانیوز جلدی خشک ناشی از Leishmania tropica وجود دارد. مخازن انگل در نوع L.major، جوندگان وحشی و موش و در نوع L.tropica، انسان می‌باشد. گاهی سگ به عنوان میزبان اتفاقی نقش دارد و جداسازی هر دو گونه‌ی عامل بیماری از این حیوان گزارش شده است (۴).

تمام گونه‌های انگل از نظر مورفولوژیکی یکسان هستند و تشخیص گونه‌ها به صورت مشاهده‌ی میکروسکوپی آماستیگوت‌های رنگ‌آمیزی شده و نیز کشت انگل در محیط in vitro امکان‌پذیر نمی‌باشد. با توجه به این که در تعدادی از موارد، بیماری دارای اشکال پیچیده با سیر طولانی و مقاوم به درمان است، بنابراین جهت شناسایی مخازن، پیش‌گیری و درمان بیماری، شناسایی گونه‌های انگل از اهمیت بسزایی برخوردار است. یکی از روش‌های توسعه یافته جهت تعیین هویت انگل Leishmania، روش مولکولی PCR (Polymerase chain reaction) می‌باشد.

یکی از ژنوم هایی دارای کاربرد زیاد در مطالعات مولکولی انگل شناسی، ژن ریبوزومی (rDNA) است که دو زیر واحد Small subunit RNA (SSU RNA) 18S و Large subunit RNA (LSU RNA) 28S را کد می‌کند.

ITS1 (Internal transcribed spacers) منطقه‌ای است که بین SSU RNA و 5.8S RNA واقع می‌باشد و ITS2 منطقه‌ای است که بین 5.8S RNA و LSU RNA قرار دارد. ژن ITS نسبت به ژن‌های rRNA در بین گونه‌ها کمتر محافظت شده است، به همین دلیل برای بررسی فیلوژنی و ارتباط ارگانیسم‌ها مناسب می‌باشد. محققین معتقد هستند که اختلاف ITS به اندازه‌ای است که می‌تواند تشخیص داخل گونه‌ای را نیز مشخص کند. ITS به دلیل اندازه‌ی به نسبت کوچک خود، در کنار قطعات به طور کامل حفاظت شده قرار دارد که پرایمرهای PCR را می‌توان برای آن‌ها طراحی کرد (۵).

مطالعات مختلفی سویه‌های شایع در منطقه‌ی آندمیک اصفهان را به روش PCR با استفاده از آنالیز Restriction fragment length polymorphism–PCR (RFLP-PCR) مورد بررسی قرار داده است. بنابراین هدف از این مطالعه، تعیین گونه‌ی انگل عامل لیشمانیازیس جلدی در بیماران مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات پوست و سالک صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان با روش دقیق و حساس ITS-PCR بود. استاندارد سازی و انجام یک روش PCR که قادر به جداسازی سویه‌ها بدون نیاز به آنالیز RFLP باشد، از مهم‌ترین اهداف این مطالعه بود؛ چرا که می‌تواند باعث توسعه‌ی استفاده از این روش دقیق در بررسی‌های میدانی این بیماری در مناطق مختلف کشور گردد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی از ۶۰ بیماری که دارای ضایعات مشکوک به لیشمانیوز جلدی (CL یا Cutaneous leishmaniasis) بودند و توسط پزشک به آزمایشگاه مرکز تحقیقات پوست و سالک صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان ارجاع شده بودند، پس از اخذ رضایت‌نامه و تکمیل پرسش‌نامه، نمونه‌برداری از محل زخم در شرایط استریل با تیغ بیستوری انجام شد.

جهت آزمایش مستقیم میکروسکوپی، ابتدا از ضایعه‌ی بیماران، اسمیری تهیه شد و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰X برای مشاهده‌ی آماستیگوت‌ها بررسی گردید. در صورت دیدن آماستیگوت جهت انجام کشت در شرایط استریل، نمونه برداری با تیغ بیستوری از محل زخم بیماران انجام شد. نمونه‌ها به محیط Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) حاوی ۲۵۰ تا ۵۰۰ واحد پنی سیلین و ۲ میلی گرم استرپتومایسین انتقال داده شدند و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد به صورت شیب دار در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ۳ الی ۴ روز با برداشت یک قطره از محیط کشت در شرایط استریل و تهیه‌ی لام مرطوب از آن، اشکال پروماستیگوت انگل مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مثبت بودن کشت‌ها از نظر وجود پروماستیگوت و بالا بودن تعداد آن، به منظور تکثیر انبوه، انگل ها به محیط کشت تک فازی ۱۶۴۰ RPMI حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد FCS (Fetal calf serum) انتقال داده شدند. سپس از پروماستیگوت‌های تکثیر یافته در محیط کشت در فاز Late Logaritmic برداشت شد و پس از سه بار شستشو و شمارش جهت مرحله‌ی بعدی مطالعه، مورد بررسی قرار گرفت.

جهت استخراج DNA انگل‌های کشت داده شده از کیت High pure PCR template preparation kit استفاده شد و بر اساس پروتکل مربوط، کلیه‌ی ایزوله‌ها مورد استخراج DNA قرار گرفتند.

جهت انجام PCR، حجم هر واکنش ۳۰ میکرولیتر انتخاب شد. این مخلوط واکنشی شامل 1X PCR buffer، ۰/۲ میلی‌مول Deoxynucleoside triphosphates (dNTP)، ۰/۵ واحد Taq DNA polymerase، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۱۰ پیکومول در لیتر از پرایمرهای Leish F (5´-CAA CAC GCC GCC TCC TCT CT-3´) و Leish R (5´-CCTCTCTTTTTTCNCTGTGC) بود.

مراحل تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در روش ITS-PCR در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. مراحل تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در روش ITS-PCR در این مطالعه

مرحله	دما (درجه‌ی سانتی گراد)	زمان	تعداد سیکل
Initial denaturation	۹۵	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴	۳۵ ثانیه	
Annealing	۶۰	۳۵ ثانیه	۳۵
Extention	۷۲	۴۵ ثانیه	
Final extention	۷۲	۵ دقیقه	۱

جهت مطالعه‌ی باندهای محصول PCR، از ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد و نتایج بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه UV DOC مشخص گردید.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی انجام شده، بیماران از منطقه‌ی هشتم شکاری، اردستان، جاده‌ی فرودگاه، قهجاورستان، سگزی، میرجاوه‌ی زاهدان، جرقویه، ملک‌شهر، شاهین‌شهر و دشت عباس خوزستان بودند. بیشترین تعداد بیماران از منطقه‌ی اردستان با تعداد ۲۴ نفر (۳۰ درصد) بود.

www.mui.ac.ir

از ۶۰ بیمار مبتلا بـه CL کـه وارد مطالعـه شـدند، ۴۱ بیمار (۶۸/۳ درصد) مرد و ۱۹ بیمار (۳۱/۷ درصد) زن و با میـانگین سـنی ۱۰/۱۸ ± ۲۸/۵۹ سـال بودنـد (جدول ۱). تعداد زخم‌ها در بیماران مختلف، بین ۱ تا ۱۰ عدد متغیر بود. ۱۸ بیمار (۳۰ درصد) دارای یک یا دو زخم بودند، در حـالی کـه ۴۲ بیمـار (۷۰ درصـد) دیگر بیش از دو زخم داشتند. در این مطالعـه مشـاهده شد که تعداد بیمـارانی کـه بـیش از یـک یـا دو زخـم داشتند، رو به افزایش است. محل زخم‌ها شامل دست، پا، صورت و نواحی دیگـر بـود و زخـم‌هـا بـه تعـداد متفاوت در این نواحی دیده شد. در مجموع، ضـایعات در دسـت و پـا در ۸۳/۳ درصـد، در صـورت ۱۱/۷ درصد و در سایر قسمت‌ها در ۵ درصد افراد مشـاهده شد. ۶۸/۳ درصد بیماران مورد مطالعـه ایرانـی و ۳۱/۷ درصد افغانی بودند.

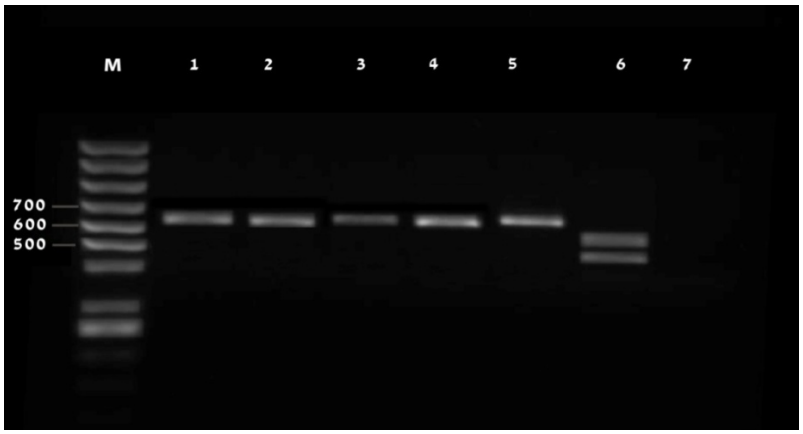
لام مسـتقیم تمـام بیمـارانی کـه از نظـر وجـود آماستیگوت مثبت بودند، مـورد آزمـایش کشـت قـرار گرفت و پس از مثبت شدن کشـت هـای بیمـاران، ۶۰ ایزوله آنالیز ITS-PCR شد.

تمامی نمونه‌های تست شده با روش ITS-PCR در کنـــــار گونـــــه‌ی اســـــتاندارد L.major (MHOM/IR/75/ER) و گونه‌ی اسـتاندارد L.tropica (MHOM/IR/99/yaz1) قرار گرفتند و وجود گونـه‌ی L.major در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها تأیید گردیـد (شـکل ۱). برای انجام تسـت ITS-PCR از ۶۰ کشـت مثبـت استفاده شد که ۱۰۰ درصد آن‌ها L.major بودند و باند ۶۷۰ bp را نشان دادند.

بحث

در مناطق اندمیک لیشمانیوز، شناسایی گونه‌های انگل در اتخاذ برنامه‌هـای پـیش‌گیـری و کنتـرل بیمـاری، امـری ضروری به نظر مـی رسـد. بـا توجـه بـه یکسـان بـودن مورفولوژی عوامل لیشمانیوز جلـدی و عـدم تشـخیص گونه های عامل بیماری از طریق مشاهدات میکروسکوپی و کشـت، روش‌هـای مولکـولی تحـولی عظیمـی را در تشخیص گونه‌های انگل، به وجود آورده است (۷-۶).

از مزایای روش‌های مولکولی نظیر PCR این است که با تعـداد کـم انگـل هـم آلـودگی قابـل تشـخیص می‌باشد و هم می‌توان گونه‌ی انگل را مشخص نمـود. یکـی از ژنـوم‌هـایی کـه جهـت مطالعـات مولکـولی



شکل ۱. تکثیر نواحی TSI ریبوزومال با استفاده از پرایمرهای Leish F ،R

شکل باندهای اختصاصی ایجاد شده توسط ۴ نمونه‌ی به دست آمده از بیماران همراه با گونه‌های استاندارد **L. major** و **L. tropica** را نشان می‌دهد. **M**: نشانگر مولکولی **bp** ۱۰۰، شماره‌های ۱ تا ۴: نمونه‌ی بیماران **L. major**، شماره‌ی ۵: استاندارد **L. major**، شماره‌ی ۶: استاندارد **L. tropica**، شماره‌ی ۷: کنترل منفی

انگل‌شناسی کاربرد زیادی دارد، ژن ریبوزومی (rDNA) است که جهت تکثیر قطعه‌ی ITS1 مورد استفاده قرار گرفته است (۹-۸). Reithinger و Dujardin بیان نمودند که حساسیت و ویژگی روش PCR نسبت به دیگر روش‌های تشخیص انگل Leishmania بیشتر می‌باشد (۱۰).

در مطالعه‌ی شهبازی و همکاران در مشهد که بر روی ۱۵۵ بیمار مبتلا به CL انجام شد، روش ITS-PCR با روش‌های پارازیتولوژیکی در تشخیص Leishmania مقایسه و نشان داده شد که حساسیت روش ITS-PCR با روش فوق ۹۸/۸ درصد بود و بیشتر از حساسیت روش‌های تشخیص میکروسکوپی (۷۹/۳ درصد) و کشت (۸۶/۲ درصد) بود و گونه‌ی غالب بیماری L. tropica گزارش شد (۵).

Bensoussan و همکاران با روش ITS-PCR نشان دادند که از ۷۴/۶ درصد نمونه‌ی مثبت لیشمانیوز در فلسطین اشغالی، ۵۹/۹ درصد از آن‌ها L. major و ۴۷/۲ درصد L. tropica بودند (۱۱).

AL-Jawabreh و همکاران در فلسطین از روش ITS-PCR جهت شناسایی گونه‌های Leishmania استفاده نمودند که از میان ایزوله‌ها، L. major ۵۷ درصد و L. tropica ۴۳ درصد بودند (۱۲). در مطالعه‌ی مسگریان و همکاران در روستاهای مرزی شهرستان گنبد کاووس با استفاده از روش ITS-PCR، گونه‌ی غالب منطقه، L. major گزارش شده است (۱۳).

در این مطالعه از کشت بیماران جهت استخراج DNA و تعیین گونه به روش ITS-PCR استفاده شد. پس از الکتروفورز، محصولات باندهای ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت که تمامی باندها در محدوده‌ی ۶۷۰ bp مشاهده گردید؛ نتیجه گرفته شد که تمامی باندها مطابق با باندهای ایجاد شده مربوط به L. major استاندارد بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که اصفهان یکی از کانون‌های مهم بیماری لیشمانیوز جلدی است، بنابراین مطالعات ژنتیکی و تعیین گونه‌ی عامل بیماری در کنترل بیماری و مبارزه با پشه ناقل و جوندگان حامل انگل Leishmania اهمیت بسزایی دارد و در بهبود روش‌های درمانی مؤثر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه‌ی طاهره (س) و نیز آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی به دلیل حمایت‌های بی‌دریغشان، نهایت تشکر و قدردانی را به عمل می‌آوریم.

References

1. Mohajery M, Hatam GR, Shamsian AA, Javaheri A. Isoenzyme identification of L.Major. J Med 2004; 47:19-27.
2. WHO. Cholera annual report 2001. Weekly Epidemiological Record 2002; 77(3): 257-68.
3. Hamzavi Y, Mohebali M, Edrisian GH, Foruzani A. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis (human infection and animal reservoir) in Dashti and Dashestan phlebotomus papatasi from Isfahan province, Iran: comparison district, Booshehr province. Journal of Iranian J Publ Hlth 2000; 29(1-4): 179-90.[In Persian].
4. Nadim A, Mesghali A, Seyedi-Rashti MA. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran B. Khorassan. IV. Distribution of sandflies. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1971; 64(6): 865-70.
5. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the

parasitological methods. Parasitol Res 2008; 103(5): 1159-62.
6. Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96(Suppl 1): S1–S250.
7. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007; 64: 1-109.
8. Dweik A, Schonian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of Leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. Ann Trop Med Parasitol 2007; 101(5): 399-407.
9. el Tai NO, Osman OF, el FM, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94(5): 575-9.
10. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol 2007; 45(1): 21-5.
11. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 44(4): 1435-9.
12. Al-Jawabreh A, Schnur LF, Nasereddin A, Schwenkenbecher JM, Abdeen Z, Barghuthy F, et al. The recent emergence of Leishmania tropica in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of L. major. Trop Med Int Health 2004; 9(7): 812-6.
13. Mesgarian F, Rahbarian N, Mahmoudi Rad M, Hajaran H, Shahbazi F, Mesgarian Z, et al. Identification of Leishmania species isolated from human cutaneous Leishmaniasis in Gonbad-e-Qabus city using a PCR method during 2006-2007. Tehran University Medical Journal 2010; 68(4) 250-265.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 175, 1st week, April 2012 Received: 29.10.2011 Accepted: 26.12.2011

Identification and Isolation of the Cause of Cutaneous Leishmaniasis in Isfahan Using ITS-PCR Method

Faezeh Mohammadi MSc[1], Manizheh Narimani MSc[2], Shahram Nekoian MSc[3], Liela Shirani Bidabadi MSc[4], Farideh Mohammadi MSc[5], Seyed Mohsen Hosseini PhD[6], Seyed Hossein Hejazi PhD[7]

Abstract

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a parasitic disease in most parts of Iran, especially in the province of Isfahan, Iran. Due to phenotypic similarities of most species of *Leishmania*, reservoir variety, and different clinical manifestations of the disease, identification of species is necessary. In this study, the isolates which caused human CL in Isfahan region were characterized using internal transcribed spacer (ITS) polymerase chain reaction (PCR) technique.

Methods: Among 60 CL suspected cases which referred to Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan, Iran, the DNA isolates of patients with positive direct cutaneous microscopy were selected. Cultures were then extracted and the species of the etiologic agents of the disease were determined by ITS-PCR.

Findings: Leishmania major was found as the predominant species (100%) which caused CL in Isfahan region.

Conclusion: Due to phenotypic similarities among different species of *Leishmania*, species identification is not possible by direct microscopy and culture. Considering the endemicity of CL in Isfahan region, 3 substantial factors including reservoir combating, treatment of patients and species characterization are of importance for disease control.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Leishmania major

[1] Department of Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Central Laboratory, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3] Department of Cellular and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[5] Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[6] Associate Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[7] Associate Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.mui.ac.ir