مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۰/هفته دوم مرداد ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۵

# بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات مس بر سوش‌های باکتریایی شایع در عفونت‌های بیمارستانی

الهام یوسفی[۱]، دکتر محمد رفیعی‌نیا[۲]، دکتر حسین فاضلی[۳]، دکتر محمد زمان کسائی[۴]

مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** در سال‌های اخیر میزان مقاومت باکتری‌ها به درمان‌های آنتی بیوتیکی به طرز نگران‌کننده‌ای زیاد شده است. از طرف دیگر سرعت کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید به هیچ وجه پاسخ‌گوی سرعت افزایش مقاومت باکتریایی نمی‌باشد و نیاز مبرم به رویکردهای جدید برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی حس می‌شود. بر همین اساس در این مطالعه اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات مس بر سوش‌های باکتریایی که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی نقش دارند، بررسی شد.

**روش‌ها:** در این مطالعه اثر نانوذرات مس با قطر متوسط ۲۰ نانومتر که با روش تبخیر قوس الکتریکی (Electric arc evaporation) تهیه شده بودند، بر روی ایزوله‌های استاندارد و بالینی اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین، انتروکوکوس فکالیس، کلبسیلا و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. در این بررسی MIC (Minimum inhibitory concentration) و MBC (Minimum bactericidal concentration) تعیین شد و سپس اثر آنتی‌باکتریال با استفاده از روش انتشار دیسکی سنجیده شد.

**یافته‌ها:** نانوذرات مس با موفقیت با روش قوس الکتریکی سنتز شدند. در جریان ۵۰ آمپر، آنالیزهای Transmission electron microscope (TEM)، XRD (X-ray diffraction) و SEM (Scanning electron microscope) نشان‌دهنده‌ی شکل‌گیری ذرات به نسبت خالص، به شدت پراکنده و قهوه‌ای رنگ نانوذرات مس با متوسط اندازه‌ی ۲۰ نانومتر بود. این نانوذرات سپس در تست انتشار دیسکی به کار گرفته شدند. نتایج این تست نشان داد که اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به نانوذرات مس حساس می‌باشند. اثر نانوذرات مس بر اشرشیا کلی از سفالکسین بیشتر ولی از سیپروفلوکساسین کمتر است. اثر نانوذرات مس بر استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین از وانکومایسین بیشتر ولی از لینزولید کمتر بود. دیگر سوش‌های باکتریایی به طور کامل به نانوذرات مس مقاوم بودند به طوریکه هاله‌ی مهار رشد در اطراف چاهک‌های حاوی نانوذرات مس در هیچ کدام از پلیت‌های کشت این باکتری‌ها مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** می‌توان از نانوذرات مس در درمان و یا پیشگیری از عفونت‌های حاصله از اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات مس، آنتی‌باکتریال، مقاومت باکتریایی

**ارجاع:** یوسفی الهام، رفیعی‌نیا محمد، فاضلی حسین، زمان کسائی محمد. **بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات مس بر سوش‌های باکتریایی شایع در عفونت‌های بیمارستانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۰): ۸۴۲-۸۳۰

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان،اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه شیمی، دانشکده‌ی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر محمد رفیعی‌نیا
Email: m_rafienia@med.mui.ac.ir



www.SID.ir

## مقدمه

از زمانی که بشر برای درمان عفونت‌های باکتریایی به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها روی آورده است، مقاومت به درمان در باکتری‌ها مشاهده شده است. این مقاومت به طور فزاینده‌ای در گونه‌های مختلف باکتری‌ها مشاهده شده است. روند این مقاومت در دهه‌ی اخیر شتاب بیشتری گرفته است (۱). بررسی‌ها نشان داده است که پیش از استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های کنترل‌کننده‌ی مقاومت دارویی در سطح بسیار پایینی در باکتری‌ها وجود داشتند و یا بیان می‌شدند اما با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها (نه تنها در بین انسان‌ها بلکه در درمان حیوانات)، باکتری‌های با ژنوتیپ‌هایی که شامل ژن‌هایی مانند ژن‌های طیف CTX-M، (که انواع بتالاکتامازها را کد می‌کنند)، به علت مزیت انتخابی خود شایع‌تر و فراوان‌تر شده‌اند. گونه‌های باکتریایی مانند استافیلوکوکوس آرئوس، گونه‌ی انتروکوکوس، انتروباکتریاسه‌ها، پسودوموناس‌ها و آسینتوباکترها به طور خاص نسبت به درمان‌های آنتی‌بیوتیک بسیار مقاوم شده‌اند، به طوری که درمان عفونت‌هایی که این باکتری‌ها موجب می‌شوند تبدیل به معضلی پیچیده در علم پزشکی شده است (۳-۱).

دلایل متعددی برای این مقاومت وجود دارد که از جمله این دلایل می‌توان به استفاده‌ی نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند استفاده‌ی نابجا از آنتی‌بیوتیک‌های قوی با طیف وسیع و یا استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها و صنایع غذایی (۴) یا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در لوازم بهداشتی و مواد تمیزکننده‌ی خانگی (۵) اشاره کرد. این عوامل باعث بروز سوش‌های فوق مقاوم (Multidrug resistant) از باکتری‌ها شده‌اند که نسبت به بخش بزرگی از درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مقاوم هستند. در صورتی که یک سوش حداقل نسبت به سه دسته‌ی آنتی‌بیوتیک مقاوم باشد، آن را فوق مقاوم می‌نامند. این امر باعث شده است که رویکردهای نوینی برای مقابله با باکتری‌ها دنبال شوند (۶).

از طرفی با ظهور علم و فناوری نانو در دهه‌ی گذشته ثابت شده است که در صورتی که اندازه‌ی مواد از اندازه‌ی میکرومتر به نانومتر کاسته شود خواص بسیار متفاوتی از نظر رسانایی جریان الکتریکی، سختی، سطح فعال و واکنش‌پذیری شیمیایی حاصل می‌شود. یکی از این خواص متفاوت و حائز اهمیت اثر آنتی‌میکروبیال نانوذرات فلزاتی مانند نقره، مس، تیتانیوم و روی می‌باشد.

یون‌های فلزی در غلظت‌های بالا خطرات بسیاری را متوجه سلامت انسان می‌کنند و بنابراین استفاده از آن‌ها یا نمک‌های آن‌ها در غلظت‌های بالا برای مقابله با رشد باکتری‌ها و یا به عنوان مواد آنتی‌باکتریال، نمی‌تواند گزینه‌ای مطلوب برای درمان یا پیشگیری از عفونت‌ها باشد. اما پیشرفت فناوری نشان داده است که استفاده از این فلزات در ابعاد نانومتر این اجازه را می‌دهد تا با استفاده از غلظت‌هایی که بسیار از غلظت‌های خطرساز برای بشر کمتر است، از اثرات آنتی‌میکروبیال آن‌ها بهره‌مند شد (۷).

با توجه به این دانسته‌ها، نانوذرات مس نه تنها قابلیت احتمالی برای استفاده در وسایل مختلف پزشکی، غیر پزشکی و مصارف مختلف بیمارستانی به صورت ادغام با مواد دیگر و یا پوشش بر روی مواد مختلف را دارند، بلکه برای جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌های متداول نیز امیدبخش می‌باشند.



Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

با این حال و با وجود تمام مطالعات صورت‌گرفته روی اثر آنتی‌میکروبیال نانوذرات مس و دیگر نانوذرات فلزی، تا کنون هیچ بررسی کاربردی با دیدگاه بالینی برای استفاده ازاین اثرات صورت نگرفته است. در حقیقت، مطالعه‌ای که اثر باکتری‌کش نانوذرات مس بر سوش‌های معمول و استاندارد باکتریایی را با آنتی‌بیوتیک‌ها مقایسه کند، انجام نشده است تا به این وسیله نشان داده شود که آیا، این تأثیر می‌تواند به قدری باشد که کاربرد بالینی داشته باشد یا خیر؟ به همین دلیل، این مطالعه به بررسی اثر نانوذرات مس بر سوش‌های باکتریایی مختلف که در عفونت‌های بیمارستانی نقش دارند، پرداخت و تأثیر این نانوذرات را در جلوگیری از رشد باکتری‌ها، با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقایسه کرد.

## روش‌ها

### سنتز نانوذرات مس

نانوذرات مس بر پایه‌ی مطالعات کسایی و همکاران به روش تبخیر قوس الکتریکی تهیه شدند (۸). در روش روش قوس الکتریکی نیاز به یک جریان برق مستقیم (DC) و میله‌های مسی تجاری است. دو میله‌ی مسی بسیار خالص (۹۰/۹۵ درصد) با قطر ۲/۵ میلی‌متر و طول ۳۰ میلی‌متر به عنوان آند متحرک و کاتد استاتیک در محیط آب مقطر به کار برده شدند. جریان ۵۰ آمپر از درون ظرفی که الکترودهای مس در آن غوطه‌ور بودند، به مدت ۱ تا ۱۰ میلی‌ثانیه عبور داده شد. ولتاژ بین کاتد و آند در ۲۵ ولت ثابت نگهداشته شد. الکترودهای مس در اثر دمای بالای قوس، گرم شدند و اتم‌های فلزی از سطح فلز جدا گردیدند و به صورت بخار فلزی درآمدند. بخار فلزی در درون آب، سرد شد و نانوذرات اولیه‌ی مس را شکل داد. حباب‌های گازی شکل‌گرفته در آب به واسطه‌ی تبخیر پلاسما و تجزیه‌ی آب و ماده‌ی آند، محصول نهایی را به سطح آب آوردند. خصوصیات نانوذرات مس تهیه‌شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope یا SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscope یا TEM) و آنالیز تفرق اشعه‌ی X (X-ray diffraction یا XRD) تعیین گردید.

در این مطالعه، برای بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات مس ابتدا حداقل غلظت مهاری (MIC یا Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت باکتری‌کش (MBC یا Minimum bactericidal concentration) این نانوذرات برای سوش‌های استاندارد و ایزوله‌های کلینیکی اشرشیا کولی (Escherichia coli)، پسودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa)، انتروکوکوس فکالیس (Enterococcus faecalis)، استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) و کلبسیلا (klebsiella) تعیین شد.

MIC نشان‌دهنده‌ی غلظتی از ماده‌ی آنتی‌باکتریال (در اینجا نانوذرات مس) می‌باشد که در حضور آن از رشد باکتری در محیط کشت جلوگیری می‌شود و MBC غلظتی از ماده‌ی آنتی‌باکتریال (در اینجا نانوذرات مس) می‌باشد که در حضور آن مقدار ماده نه تنها از رشد باکتری در محیط کشت جلوگیری می‌شود بلکه به صورت تقریبی تمام باکتری‌های موجود در محیط نیز کشته می‌شوند و از بین خواهند رفت.


Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه، برای تعیین مقادیر MIC و MBC ازروش رقت‌سازی سریال (Serial dilution) استفاده شد. در ابتدا سوش‌های استاندارد باکتری‌های اشرشیا کولی، پسودوموناس آئروژینوزا، انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین و کلبسیلاخریداری شد و ایزوله‌های کلینیکی این باکتری‌ها نیز از بخش میکروبیولوژی آزمایشگاه بیمارستان الزهرای (س) اصفهان تهیه گردید.

جهت این که بررسی‌های صورت‌گرفته جامع‌تر و کاربردی‌تر باشد، آزمایشات روی سوش‌های استاندارد (که از شرکت‌های مدیا تهیه گردید) و ایزوله‌های کلینیکی (که از آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان الزهرا (س) تهیه شد) به صورت جداگانه انجام گرفت.

در اولین قدم پس از تهیه‌ی باکتری‌ها، هر باکتری جداگانه و ۲۴ ساعت پیش از انجام رقت‌سازی سریال بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد و سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن سوسپانسیون‌های باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند که حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ واحد کلنی در میلی‌لیتر از هر باکتری تهیه شد.

برای تهیه‌ی استوک نانوذرات مس، ۱ گرم نانوذره در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع ریخته شد و مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در سونیکاتور (ساخت شرکت Mandel، کانادا) قرار داده شد تا سوسپانسیونی یک دست از محیط کشت و نانوذره با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آید.

برای هر سوش باکتری در یک لوله‌ی آزمایش دیگر ۹/۹ میلی‌لیتر محیط کشت مایع ریخته شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند از باکتری به آن اضافه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از آن در هر کدام از ۱۰ لوله‌ی آزمایش آماده شد و برای آن سوش ریخته شد و عملیات رقت‌سازی برای هر سوش انجام گرفت تا در پایان به ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲/۵، ۱۵۶/۲۵، ۷۸/۱۲، ۳۹/۶ و ۱۹/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر در لوله‌ها ایجاد گردید.

نمونه‌ی شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر باکتری به همراه محیط کشت بود که نشان‌دهنده‌ی پروفایل رشد باکتری‌ها در غیاب نانوذرات مس بود. در صورت مقاوم بودن باکتری به غلظت‌های فوق یک لوله‌ی آزمایش با غلظت ۲۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز تهیه گردید و مورد آزمایش قرار گرفت.

پس از انجام رقت‌سازی سریال برای سوش‌های استاندارد و ایزوله‌های کلینیکی، تک تک سوش‌های باکتریایی به صورت جداگانه، سوسپانسیون‌های نهایی در انکوباتور دارای تکاندهنده‌ی دورانی (Rotational shaker) با دور ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت، لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شدند. افزایش کدورت هر کدام از لوله‌های آزمایش که برای هر باکتری آماده شده بود بررسی شد. این افزایش کدورت نشان‌دهنده‌ی رشد باکتری‌ها بود. کمترین غلظتی از نانوذرات مس که باعث شفاف باقی ماندن محیط کشت گردید، نشان‌دهنده‌ی عدم رشد باکتری‌ها در آن لوله‌ی آزمایش بود. این غلظت به عنوان MIC برای آن سوش باکتری ثبت گردید.

پس از تعیین MIC، برای تعیین MBC، از غلظت تعیین‌شده‌ی MIC و غلظت‌های بیشتر از آن به طور



Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

جداگانه یک لوپ از محلول برداشته شد و در محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از این زمان، محیط‌های کشت بررسی شدند و غلظتی از نانوذرات مس که باعث عدم وجود کلنی‌های باکتری در محیط کشت شده بود به عنوان MBC، نانوذرات مس برای باکتری مورد نظر ثبت گردید.

برای سنجش حساسیت باکتری ها به آنتی‌بیوتیک و نانوذرات از Kirby-bauer antibiotic testing یا Disk diffusion antibiotic sensitivity testing استفاده شد. در این آزمون از دیسک‌های کوچک آغشته به آنتی‌بیوتیک استفاده شد. بدین منظور در ابتدا آنتی‌بیوتیک‌هایی که هر سوش به آن‌ها حساسیت بالایی نشان می‌دهند و برای درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها استفاده می‌شوند بر اساس استاندارد CLSI (Clinical and laboratory standards institute) تعیین شدند. برای هر سوش باکتری، ۲ آنتی‌بیوتیک انتخاب شد که در جدول ۱ ارائه شده است.

**جدول ۱. سوش‌های باکتریایی و آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده برای هر یک از آن‌ها**

| باکتری | آنتی‌بیوتیک |
|---|---|
| اشرشیا کلی | Ciprofloxacin<br>Cephalexin |
| پسودوموناس آئروژینوزا | Meropenem<br>Ceftazidim |
| انتروکوکوس فکالیس | Linezolide<br>Vancomycin |
| استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین | Linezolide<br>Vancomycin |
| کلبسیلا | Meropenem<br>Ceftazidim |

۲۴ ساعت قبل از انجام تست انتشار دیسکی باکتری‌های تهیه‌شده، که در حالت فریز خشک نگهداری می‌شد، کشت داده شد و آماده گردید. در مرحله‌ی بعد، برای هر سوش باکتری یک محیط Mueller-Hinton agar برداشته و به وسیله‌ی سر یک پیپت پاستور با قطر ۰/۶ میلی‌متر، چاهکی در آن ایجاد شد (قطر این چاهک با قطر دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی برابر بود)؛ برای این که ته چاهک بسته شود و نانوذره از آن نشت نکند، یک قطره از محیط کشت مایع‌شده توسط حرارت، در ته آن چکانده شد که بلافاصله جامد شد و چاهک برای نانوذرات آماده گردید.

پس از این، باکتری مورد نظر در محیط مولر کشت داده شد و در ادامه درون هر یک از دو چاهک ایجاد شده ۳۰ و ۲۰ میلی‌گرم نانوذره‌ی مس ریخته شد (۳۰ میلی‌گرم نانوذره در چاهک‌های مربوط به باکتری‌های مقاوم ریخته شد) و دو دیسک آنتی‌بیوتیکی هم با فاصله‌ای بیش از ۲۴ میلی‌متر، روی پلیت قرار گرفتند.

هنگامی که همه‌ی پلیت‌ها آماده گردید، برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و سپس میزان هاله‌ی ایجادشده توسط نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری و ثبت گردید

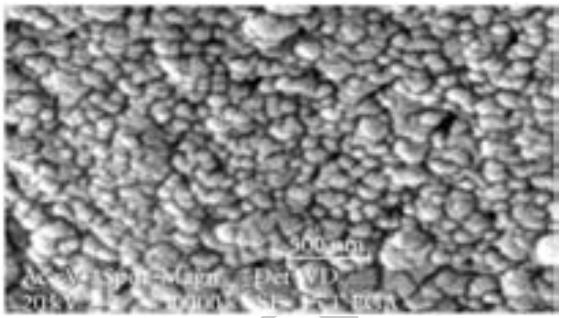
## یافته‌ها

نتایج آنالیز XRD و SEM نشان‌دهنده‌ی شکل‌گیری پودر یکنواخت قهوه‌ای رنگ از نانوذرات مس خالص بود (شکل‌های ۱ و ۲). بر این اساس اندازه‌ی متوسط نانوذرات مس ۵۸ نانومتر بود. خطوط XRD در ۱۱۱، ۲۰۰ و ۲۲۰به ترتیب در 2θ معادل ۷۴/۱۰ درجه، ۵۰/۴۳ درجه، ۴۳/۲۹ درجه، بیانگر شکل‌گیری نانوذرات مس خالص بود. الگوی XRD نانوذرات

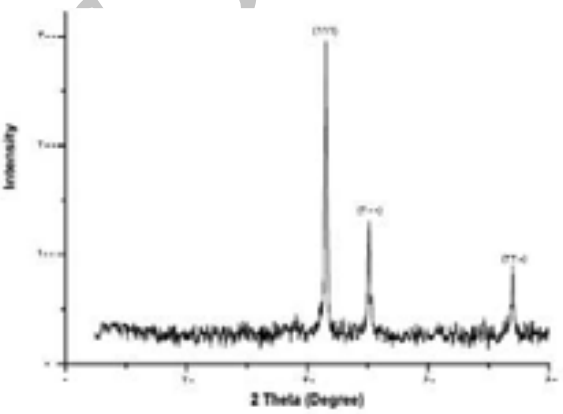


Archive of SID
www.SID.ir

مس، بعد از یک ماه نگهداری در هوای آزاد یا آب مقطر تغییر نکرد.

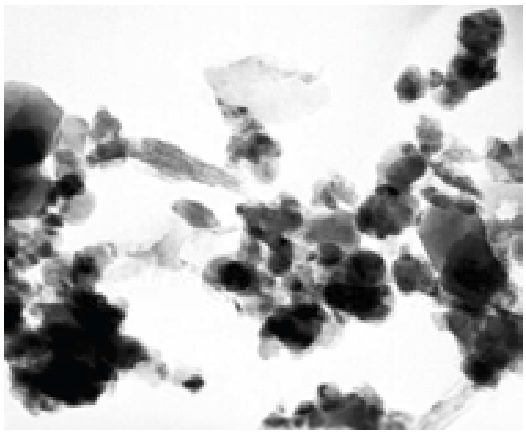


**شکل ۱. تصویر Scanning electron microscope (SEM) نانوذرات مس تهیه‌شده به روش تبخیر قوس الکتریکی در آب مقطر و جریان ۵۰ آمپر**



**شکل ۲. الگوی XRD (X-ray diffraction) نانوذرات مس تهیه‌شده به روش تبخیر قوس الکتریکی در آب مقطر و جریان ۵۰ آمپر**

تصویر TEM نانوذرات مس نشان‌دهنده‌ی شکل‌گیری ذرات کروی بود که تأییدی بر نتایج حاصل از بررسی تصویر SEM تهیه‌شده از این نمونه بود (شکل ۳). با فرض کروی بودن نانوذرات، قطر متوسط آن‌ها در حدود ۲۰ نانومتر تخمین زده شد، که این مقدار میانگین قطر ۵۰ ذره در تصویر TEM در جهات مختلف بود. این نتیجه به طور قابل توجهی با مقدار متوسط قطر اندازه‌گیری‌شده با روش SEM، که ۵۸ نانومتر بود، متفاوت بود. این موضوع نشان‌دهنده‌ی دقت بالای روش TEM می‌باشد. با این حال، به دلیل ابعاد بسیار کوچک و انرژی سطحی بالای نانوذرات این امکان وجود دارد که آن‌ها به یکدیگر بچسبند (شکل ۳).



**شکل ۳. تصویر Transmission electron microscope (TEM) نانوذرات مس تهیه‌شده به روش تبخیر قوس الکتریکی در آب مقطر و جریان ۵۰ آمپر**

نتایج مربوط به تعیین MIC و MBC در جدول ۲ ارائه شده است.

تعیین MIC و MBC در سوش‌های مختلف باکتریایی نشان داد که باکتری اشرشیا کولی و استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به نانوذرات مس حساس بودند. این حساسیت به طور خاص در مورد استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین قابل توجه بود؛ هم گونه‌ی استاندارد و هم گونه‌ی بالینی بررسی‌شده نسبت به نانوذرات حساسیت نشان دادند و میزان MIC هر دو آن‌ها ۳۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. MBC نانوذرات مس نیز در مورد هر دو گروه استاندارد و بالینی استافیلوکوکوس ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.



Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲. میزان MIC و MBC هر یک از سوش‌های باکتریایی بررسی‌شده

| سوش باکتری | MIC (میکروگرم در لیتر) | MBC (میکروگرم در لیتر) |
|---|---|---|
| اشرشیا کلی* (ATCC:25922) | ۱۲۵۰ | ۵۰۰۰ |
| اشرشیا کلی | ۶۲۵ | ۵۰۰۰ |
| پسودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:27853) | تا غلظت ۲۰۰۰۰ مقاومت نشان داد. | – |
| پسودوموناس آئروژینوزا | تا غلظت ۲۰۰۰۰ مقاومت نشان داد. | – |
| انتروکوکوس فکالیس* (ATCC:29212) | تا غلظت ۲۰۰۰۰ مقاومت نشان داد. | – |
| انتروکوکوس فکالیس | تا غلظت ۲۰۰۰۰ مقاومت نشان داد. | – |
| استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین* (ATCC:43300) | ۳۱۲/۵ | ۱۲۵۰ |
| استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین | ۳۱۲/۵ | ۱۲۵۰ |
| کلبسیلا* (ATCC:13883) | تا غلظت ۲۰۰۰۰ مقاومت نشان داد. | – |
| کلبسیلا | تا غلظت ۲۰۰۰۰ مقاومت نشان داد. | – |

*: نوع استاندارد سوش

MIC: Minimum inhibitory concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration

اشرشیا کولی ایزوله‌ی استاندارد، مقاومت بیشتری نسبت به نانوذرات مس از خود بروز داد و میزان MIC آن ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد، در حالی که این میزان برای سوش استاندارد اشرشیا کولی، ۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. MBC هر دو این ایزوله‌ها ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید (جدول ۲).

دیگر سوش‌های بررسی‌شده در این مطالعه، سودوموناس آئروژینوزا، انتروکوکوس فکالیس و کلبسیلا، بودند که نسبت به نانوذرات مس کاملا مقاوم بودند به نحوی که حتی تا غلظت ۲۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز تأثیری در جهت جلوگیری از رشد این سوش‌ها مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۳ اطلاعات مربوط به انتشار دیسکی را ارائه می‌دهد.

در بررسی انتشار دیسکی نتایجی منطبق با یافته‌های حاصل از مرحله‌ی تعیین MIC و MBC به دست آمد. قطر ناحیه‌ی مهار رشد باکتری در مورد سوش استاندارد اشرشیا کلی، برای آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفالکسین و نانوذرات مس، به ترتیب ۲۰، ۸ و ۹ میلی‌متر به دست آمد. در مورد ایزوله‌ی بالینی اشرشیا کلی نیز حساسیت به موارد فوق‌الذکر به ترتیب ۲۲، ۱۳ و ۱۶ میلی‌متر بود.

در مورد سوش استاندارد استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین قطر ناحیه‌ی مهار رشد باکتری برای آنتی‌بیوتیک‌های لینزولید، وانکومایسین و نانوذرات مس به ترتیب ۱۷، ۹ و ۱۳ میلی‌متر بود. این مقدار برای ایزوله‌ی بالینی استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین در مقابل همان نوع آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب ۱۵، ۶ و ۱۳ میلی‌متر بود. در مورد دیگر سوش‌ها اثر مهاری از نانوذرات مشاهده نشد. نکته‌ی جالب مقاوم بودن کامل ایزوله‌ی بالینی سودوموناس به آنتی‌بیوتیک‌های رایج علاوه بر مقاومت به نانوذرات مس بود (جدول ۳).

شکل ۴ نتایج بررسی انتشار دیسکی در سوش‌های استافیلوکوکوس، اشرشیا کلی و سودوموناس را نشان می‌دهد.



Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳. نتایج بررسی تست انتشار دیسکی

| سوش باکتری | میانگین قطر ناحیه‌ی مهار رشد (میلی‌متر) | | | مقدار P[1] | مقدار P[2] |
|---|---|---|---|---|---|
| | آنتی‌بیوتیک | | نانوذرات مس | | |
| | ۱ | ۲ | | | |
| اشرشیا کلی* (ATCC:25922) | CP: ۳/۵۵ ± ۲۰ | CN: ۱/۷۵ ± ۸ | ۱/۲۵ ± ۹ | < ۰/۰۱ | ۰/۰۱ |
| اشرشیا کلی | CP: ۴/۳۸ ± ۲۲ | CN: ۲/۶۵ ± ۱۳ | ۱/۷۵ ± ۱۶ | ۰/۰۱ | ۰/۰۱ |
| پسودوموناس آئروژینوزا* (ATCC:27853) | MEN: ۱۰ | CAZ: ۱۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| پسودوموناس آئروژینوزا | MEN: ۰ | CAZ: ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| انتروکوکوس فکالیس* (ATCC:29212) | LZ: ۹ | V: ۴ | ۰ | ۰ | ۰ |
| انتروکوکوس فکالیس | LZ: ۱۰ | V: ۳ | ۰ | ۰ | ۰ |
| استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین* ATCC:43300 | LZ: ۴/۵۰ ± ۱۷ | V: ۴/۵۴ ± ۹ | ۳/۲۵ ± ۱۳ | ۰/۰۱ | > ۰/۰۵ |
| استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین | LZ: ۴/۶۰ ± ۱۵ | V: ۰/۵۶ ± ۶ | ۴/۲۵ ± ۱۳ | > ۰/۰۵ | > ۰/۰۵ |
| کلبسیلا* (ATCC:13883) | MEN: ۱۱ | CAZ: ۱۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| کلبسیلا | MEN: ۱۰ | CAZ: ۸ | ۰ | ۰ | ۰ |

*: نوع استاندارد سوش  مقدار P[1]: مقایسه‌ی بین آنتی‌بیوتیک ۱ و نانوذرات  مقدار P[2]: مقایسه‌ی بین آنتی‌بیوتیک ۲ و نانوذرات

CP :Ciprofloxacin; CN :Cephalexin; MEN :Meropenem; CAZ :Ceftazidim; LZ :Linezolide; V :Vancomycin

الف  ب  ج

**شکل۴. الف: اثر نانوذرات مس بر ایزوله‌ی استاندارد اشرشیا کلی، ب: اثر نانوذرات مس بر ایزوله‌ی کلینیکی استافیلوکوکوس، ج: نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و سفتازیدیم هیچ کدام بر ایزوله‌ی کلینیکی پسودوموناس اثر نداشتند.**

## بحث

مواد حاوی مس از جمله $CuSO_4$ و $Cu(OH)_2$ به عنوان مواد آنتی‌میکروبیال غیر ارگانیک شناخته شده‌اند (۹). شارژ الکتریکی دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها به طور کلی منفی است که به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیلیک در لیپوپروتئین سطح دیواره است (۱۰). به دلیل شارژ مخالف باکتری و یون‌های مس آزادشده از نانوذرات، بین آن‌ها چسبندگی و بیواکتیویتی صورت می‌گیرد و با تخریب دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها، مرگ باکتری رخ می‌دهد. در مطالعات انجام‌شده، در غلظت‌های پایین‌تر نانوذرات تنها تأخیر در فاز تأخیری (Lag Phase) باکتری‌ها


www.SID.ir

مشاهده شده است، در صورتی که در غلظت‌های بالاتر که یون‌های آزادشده $Cu^{2+}$ بیشتری در محیط کشت مایع وجود دارد، رشد باکتری‌ها متوقف شده است. تمام این نتایج نشان‌دهنده‌ی اهمیت وجود غلظت کافی یون مس در محیط کشت مایع برای جلوگیری از رشد و مرگ باکتری می‌باشد (۱۱).

به نظر می‌رسد که مکانیسم اعمال اثر باکتریسیدال نانوذرات مس، آزاد شدن یون‌های $Cu^{2+}$ از این نانوذرات می‌باشد که به دلیل داشتن بار مثبت، جذب بار نفی لیپوپروتئین‌های دیواره‌ی سلول باکتریایی می‌شوند و با ورود به سلول باعث صدمه زدن به دیواره‌ی سلولی آن یا ایجاد تغییرات در عملکرد آنزیمی آن می‌شوند و یا باعث ایجاد سوراخ در دیواره‌ی سلولی می‌شوند (۱۲، ۱۰).

در مجموع مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات خود قابلیت نفوذ به باکتری را دارند. ممکن است این قابلیت به دلیل القای تغییرات مورفولوژیک در دیواره‌ی سلولی باشد که در نتیجه‌ی آن مواد داخل سلولی به بیرون نشت می‌کند و موجب مرگ باکتری را فراهم می‌آورد. بررسی‌های صورت‌گرفته با SEM نشان‌دهنده‌ی وجود حفرات و سوراخ‌هایی در دیواره‌ی سلولی باکتری‌های اشرشیا کلی که در معرض نانوذرات قرار گرفته‌اند می‌باشد (۱۰).

بررسی‌ها همچنین نشان داده‌اند که خواص باکتریوسیدال نانوذرات فلزی از اندازه‌ی کوچک و نسبت بالای سطح به حجم این مواد منشأ می‌گیرد. Morones و همکاران نشان دادند که یون‌های نقره با ابعاد ۱ تا ۱۰ نانومتر، بیشترین تماس با سطوح سلولی باکتری‌ها را دارند و اثرات باکتریوسیدال آن‌ها حداکثر است (۱۳).

Ruparelia و همکاران تأثیر آنتی‌میکروبیال نانوذرات مس و نقره را بر علیه گونه‌های مختلف باکتریایی سنجیده‌اند. در این مطالعه آن‌ها نانوذرات ۳ و ۹ نانومتر از نقره و مس را علیه چهار سوش اشرشیا کلی، سه سوش استافیلوکوکوس آرئوس و باسیلوس سابتیلیس استفاده کردند و میزان کارآیی آن‌ها را بررسی نمودند. این مطالعه نشان داد که در حالی که نانوذرات نقره به صورت خالص باقی می‌مانند، نانوذرات مس را لایه‌ای نازک از اکسید مس می‌پوشاند. در این مطالعه نانوذرات نقره در مقابله با رشد باکتری‌های استافیلوکوکی و اشرشیا کلی مؤثرتر از نانوذرات مس بودند (۱۲).

در قسمت نخست مطالعه، MIC و MBC نانوذرات تعیین شد تا مشخص شود حداقل مقداری از نانوذرات مس مورد مطالعه که اثر باکتریسیدال از خود بروز می‌دهد، چقدر است؟ این بررسی از آن جهت اهمیت داشت که اطمینان حاصل شود مقدار کافی از نانوذرات در چاهک‌های پلیت‌های آنتی‌بیوگرام برای مقایسه با اثر آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشته باشد.

البته مطالعات زیادی در این زمینه انجام گرفته است و MIC و MBC برای نانوذرات مختلف فلزی با اندازه‌های مختلف تعیین شده‌اند، ولی به دلیل همین تفاوت‌ها و تنوع‌های موجود در روش‌های ساخت نانوذرات، اندازه‌ی نانوذرات، سوش‌های باکتریایی مورد مطالعه و موارد دیگر، به نظر نمی‌رسید که بتوان نتایج آن مطالعات را برای مطالعه‌ی حاضر تعمیم داد و استفاده نمود. با این وجود از مقایسه‌ی نتایج به دست‌آمده در این مطالعه با دیگر مطالعات نکاتی آشکار می‌شود. به عنوان مثال



Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعه‌ی Ruparelia و همکاران با توجه به نتایج به دست‌آمده از باکتری‌های اشرشیا کلی و استاف اورئوس، استنتاج شد که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت به نانوذرات بیش از گرم منفی‌ها می‌باشد، که با توجه به مقاومت بسیار بیشتر استاف اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها نتیجه‌ای جالب توجه و حائز اهمیت می‌باشد (۱۲). از دلایلی که برای این موضوع بیان شده است وجود غشای مستحکم لیپو پلی‌ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی و همچنین پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مقاوم به فلزات می‌باشد (۱۴).

با وجود این که در این مطالعه نتیجه‌ی مشابهی از حساسیت بیشتر استاف اورئوس نسبت به اشرشیا کلی به نانوذرات مس به دست آمد ولی با توجه به نتایج دیگر، گرم مثبت‌ها و منفی‌ها از این قاعده تبعیت نکردند. به عنوان مثال انتروکوک، که یک باکتری گرم مثبت می‌باشد، نسبت به نانوذرات از خود مقاومت نشان داد، اما همان طور که اشاره شد باکتری گرم منفی اشرشیا کلی نسبت به نانوذرات حساس بود.

در مجموع میزان MIC و MBC به دست‌آمده در این مطالعه و همچنین مقادیر ارائه‌شده در مطالعات مشابه مرتبط با اثر نانوذرات مس (۱۵، ۱۱)نشان می‌دهند که این نانوذرات، در غلظت‌هایی که بسیار پایین‌تر از غلظت سمی یون مس برای انسان است (۱۶)، اثری قابل توجه بر باکتری‌های استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین و اشرشیا کلی دارند و این مورد می‌تواند در اتخاذ رویه‌های جدید نسبت به درمان یا پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی حاصل از این دو سوش مورد استفاده قرار گیرد.

در قسمت دوم مطالعه، برای هر باکتری ناحیه‌ی مهار رشد برای دو آنتی‌بیوتیک (که آن سوش هنوز به آن حساسیت داشت) و نانوذرات مورد مطالعه تعیین شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در مورد سوش‌های باکتریایی که مقاومت کامل نسبت به خواص آنتی‌باکتریال نانوذرات مس نشان می‌دادند، هاله‌ی جلوگیری از رشد مشاهده نشد؛ ولی در مورد استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین و اشرشیا کلی، نانوذرات مس اثری قابل توجه به نمایش گذاشتند. در مورد استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین (هم در ایزوله‌ی استاندارد و هم در ایزوله‌ی بالینی) هاله‌ی جلوگیری از رشد نانوذرات مس از هاله‌ی به دست‌آمده از اثر آنتی‌بیوتیک وانکومایسین بزرگ‌تر بود، اما مقایسه‌ی آماری تفاوت معنی‌داری بین این دو را نشان نداد. در مورد اشرشیا کلی نیز میزان اثربخشی نانوذرات مس در جلوگیری از رشد باکتری‌ها از سفالکسین به طور معنی‌داری بیشتر بود.

این نتایج می‌توانند نویدبخش این باشند که شاید بتوان از نانوذرات مس در درمان و یا پیشگیری از عفونت‌های حاصل از استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین و اشرشیا کلی استفاده کرد. این دو از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند (۱۷) و شاید بتوان با استفاده از روش‌هایی مانند ایجاد پوششی از نانوذرات مس بر روی وسایل پزشکی میزان شیوع عفونت‌های حاصل از این دو سوش را در بیمارستان‌ها کاهش داد.

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که اگر چه به نظر نمی‌رسد نانوذرات به تنهایی قادر به جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌ها برای همه‌ی سوش‌های باکتریایی باشند ولی شاید بتوان اثر هم‌افزایی (Synergist) این نانوذرات را بررسی نمود؛ بدین معنی که ممکن است


www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Archive of SID

نانوذرات با هم و یا با دیگر مواد آنتی‌باکتریال مانند آنتی‌بیوتیک‌ها اثر هم‌افزا نشان دهند و در مبارزه با معضل رو به گسترش مقاومت‌های باکتریایی کمک‌کننده باشند.

به عنوان مثال در مطالعه بانویی و همکاران نشان داده شده است که نانوذرات روی اثر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین علیه استافیلوکوکوس‌ها را افزایش می‌دهند، در حالی که همزمان اثر بعضی دیگر آنتی بیوتیک‌ها مانند آموکسی سیلین، پنی سیلین و نیتروفورانتوئین را کاهش می‌دهند. ترکیب نانوذرات روی و سیپروفلوکساسین همچنین به میزان قابل توجهی اثر آنتی باکتریال بر علیه اشرشیا کلی را افزایش می‌دهد و این اثر آنتی باکتریال وابسته به غلظت نانوذرات روی می‌باشد و با افزایش غلظت نانوذرات روياثر باکتری کش آن افزایش می‌یابد (۱۸).

به نظر می‌رسد که شواهد موجود تا حد زیادی اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات مسی در محیط برون تن (In vitro) را نشان داده باشد، اما کماکان نیاز به مطالعات درون تن (In vivo) در این زمینه می‌باشد تا بتوان از کارایی و ایمنی این نانوذرات اطمینان حاصل نمود.

## References


1. Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2008; 62(Suppl 1): i1-i9.
2. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother 2009; 64(Suppl 1): i3-10.
3. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis 2003; 36(Suppl 1): S11-S23.
4. Arnold SR. Revenge of the killer microbe. CMAJ 2007; 177(8): 895-6.
5. Aiello AE, Larson E. Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. Lancet Infect Dis 2003; 3(8): 501-6.
6. Jain A, Dixit P. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? J Biosci 2008; 33(4): 605-16.
7. Blanc DS, Carrara P, Zanetti G, Francioli P. Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control Legionella: seven years of experience in a university teaching hospital. J Hosp Infect 2005; 60(1): 69-72.
8. Kassaee MZ, Buazar F, Motamedi E. Effects of current on arc fabrication of Cu nanoparticles. J Nanomater 2013; 2010 (2010).
9. Hughes MN, Poole RK. Metals and microorganisms. London, UK: Chapman and Hall Publications; 1989.
10. Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL, Klabunde KJ. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. Langmuir 2002; 18(17): 6679-86.
11. Raffi M, Mehrwan S, Bhatti T, Akhter J, Hameed A, Yawar W, et al. Investigations in to the antibacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli. Ann Microbiol 2010; 60(1): 75-80.
12. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater 2008; 4(3): 707-16.
13. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005; 16(10): 2346-53.
14. Hoseinzadeh E. Evaluation of antimicrobial propertice of copper oxide nanoparticle, zinc oxide nanoparticle and their combine against bacterial nasocomial infections Agents [Thesis] Hamedan, Iran: Hamedan University of Medical Sciences; 2011. [In Persian].
15. Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. Int J Antimicrob Agents 2009; 33(6): 587-90.
16. Toxicology Data Network. Copper(II) Sulfate [Online] 1985 Jul 7. [cited 2002 Jun 11]; Available from: URL:http:// toxnet. nlm.nih.gov/cgi-bin/ sis/search/a? dbs+hsdb: @term+@DOCNO+916.
17. Jarvis WR, Martone WJ. Predominant




Archive of SID
www.SID.ir

pathogens in hospital infections. J Antimicrob Chemother 1992; 29(Suppl A): 19-24.

**18.** Banoee M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballegh A, et al. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2010; 93(2): 557-61.

Archive of SID



www.SID.ir

**Journal of Isfahan Medical School**
Received: 22.05.2013
**Vol. 31, No. 240, 2nd Week, August 2013**
Accepted: 06.07.2013

# In-Vitro Effects of Copper Nanoparticles on Common Bacterial Strains Implicated in Nosocomial Infections

Elham Yousefi[1], Mohammad Rafienia PhD[2], Hossein Fazeli PhD[3], Mohammad Zaman Kasai PhD[4]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** In recent years, the bacterial resistance to antibiotics has grown at a worrying speed. On the other hand, the rate of discovery of new antibiotics has failed to keep up with the emergence of resistance. Thus, there is a need for new approaches for fighting bacterial infections. We studied the antibacterial properties of copper nanoparticles (Cu Nps) on most culpable bacterial strains for nosocomial infections.

**Methods:** The effect of copper nanoparticles on in-vitro growth of standard and clinical strains of Escherichia coli, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), Enterococcus feacalis, Klebsiella and Pseudomonas aeuroginosa was studied. Copper nanoparticles with average diameter of 20 nm were synthesized by electric arc evaporation technique. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined and the antibacterial effects were compared to the common antibiotics used to treat these strains bymeans of disk diffusion method.

**Findings:** The arc-fabricated copper nanoparticles were successfully synthesized. At 50 A, transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscope (SEM) analyses showed fabrication of relatively pure, dispersed and brown Cu Nps with average size of 20 nm. Escherichia coli and MRSA showed acceptable levels of susceptibility to Cu Nps; the effects of copper nanoparticles were greater than cephalexin in suppressing Escherichia coli colony formation while the Cu Nps were more effective than vancomycin in suppressing MRSA growth. Other strains showed resistance to Cu Nps.

**Conclusion:** Using copper nanoparticles may be a viable approach in treating or preventing infections caused by Escherichia coli or MRSA.

**Keywords:** Copper nanoparticles, Antibacterial, Bacterial resistance

**Citation:** Yousefi E, Rafienia M, Fazeli H, Zaman Kasai M. **In-Vitro Effects of Copper Nanoparticles on Common Bacterial Strains Implicated in Nosocomial Infections.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(240): 830-42

* This paper is derived from a medical doctorate thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Biosensor Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Chemistry, School of Chemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
**Corresponding Author:** Mohammad Rafienia PhD, Email: m_rafienia@med.mui.ac.ir



www.SID.ir