Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۵، شماره‌ی ۱۰۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۴۳ تا ۵۵

بررسی اثر مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون و تعیین میزان بیان پمپ ترشحی MexCD-oprJ بر روی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری شهر تهران

سمیرا تراشی[۱]، دکترحسین گودرزی[۲]، دکتر علی هاشمی[۳]، ندا یوسفی نوجوکامبری[۱]، مهرزاد صدرالدین امین[۱]، الهه تاکی[۱]، محبوبه ستارزاده تبریزی[۴]

نویسنده‌ی مسوول: گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران hashemi1388@yahoo.com

دریافت: ۹۴/۱۱/۱۰ پذیرش: ۹۵/۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: *فعالیت پمپ‌های ترشحی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد که مانع تجمع دارو درون باکتری می‌گردد. لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) و تعیین میزان بیان پمپ ترشحی MexCD-oprJ در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری شهر تهران در سال‌های ۹۳ تا ۹۴ بود.*

روش بررسی: *این مطالعه‌ی توصیفی بر روی ۱۰۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا از بیماران دچار سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری انجام گرفت. تست‌های آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث براساس رهنمودهای CLSI و بررسی اثر مهارکننده کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) به روش میکرودایلوشن براث انجام گردید. میزان بیان پمپ ترشحی MexCD-oprJ با تکنیک Real-Time PCR تعیین شد و درنهایت جهش‌های ژن nfxB با روش‌های PCR و Sequencing تعیین گردید.*

یافته‌ها: *از مجموع ۱۰۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا، بیشترین حساسیت و مقاومت به ترتیب نسبت به کلیستین (۱۰۰ درصد) و تیکارسیلین (۹۸ درصد) گزارش شد و در ۱۶ ایزوله، اثر مهاری کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون دیده شد. نتایج Real-time PCR برای این ایزوله‌ها، افزایش بیان محدوده‌ی ۱۵/۳۴-۰/۲۶ برابری (میانگین ۴/۱ برابر) را مشخص کرد و تعیین سکانس توالی nfxB، تغییر لوسین به پرولین را در موقعیت ۱۴ نشان داد.*

نتیجه گیری: *افزایش بیان پمپ ترشحی MexCD-oprJ در این مطالعه گواهی بر گسترش موتانت‌های nfxB در عفونت‌های سوختگی می‌باشد، بنابراین مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون جهت تداخل در عملکرد این پمپ‌ها می‌تواند مفید باشد.*

واژگان کلیدی: ***سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پمپ ترشحی MexCD-oprJ، کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون، Real-time PCR***

۱- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲-دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،تهران
۳- دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی، بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری، تهران

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

مقدمه

سوختگی از جمله جراحت‌های رایج و مخربی است که نیاز به مراقبت‌های فوری دارد تا از بروز عوارض آن جلوگیری شود. یکی از مهم‌ترین این عوارض، عفونت زخم سوختگی می‌باشد (۱). از رایج‌ترین پاتوژن‌های عامل عفونت‌های جدی در این بیماران *سودوموناس آئروژینوزا*، *استنوتروباکتربومانی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌باشند. *سودوموناس آئروژینوزا* عامل عفونت‌هایی از قبیل پنومونی، عفونت دستگاه ادراری، باکتریمی، اندوکاردیت، عفونت پوستی، عفونت گوش و عفونت چشم در افراد بستری در بیمارستان می‌باشد (۴-۲). *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران دچار سوختگی باعث التهاب، تحریک سیستم ایمنی و ایجاد زخم‌های چرکی پوستی می‌گردد (۷-۵). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که این باکتری عامل ۱۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی، ۱۱ درصد عفونت‌های خونی و ۴ درصد اپیدمی‌های بیمارستانی می‌باشد (۸). از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها، می‌توان به بتالاکتامازها، پمپ‌های ترشحی و پورین‌های غشای خارجی اشاره کرد (۹). در سودوموناس چندین پمپ ترشحی وجود دارد که یکی از مهم‌ترین این پمپ‌های ترشحی MexCD-oprJ است (۱۱و۱۰). این پمپ، یک پمپ القایی است که در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط‌های آزمایشگاهی بیان نمی‌شود، ولی در موتانت‌های مقاوم به چند دارو نوع *nfxB* بیان بالایی دارد، در این موتانت‌ها MexCD-oprJ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل فلوروکینولون‌ها، ماکرولیدها، تتراسیکلین و برخی از بتالاکتام‌ها مثل سفپیروم، کلرامفنیکل، تایجی سیکلین و بیوسایدهایی مثل تری‌کلوزان و کلرهگزیدین، رنگ‌ها و دترجنت‌ها را کنترل می‌کند (۱۳و ۱۲). این پمپ ترشحی در ارتباط با مقاومت ذاتی آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نمی‌باشد ولی افزایش بیان آن در سویه‌های موتانت *nfxB* با ایجاد مقاومت اکتسابی در این ارگانیسم مرتبط می‌باشد (۱۵و ۱۴). ژن *nfxB* کروموزومی بوده که در بالادست سکانس *mexC* از ژن *mexCD-oprJ* قرار گرفته است و در تنظیم بیان اوپرون پمپ ترشحی MexCD-oprJ نقش دارد. ایجاد موتاسیون در ژن *nfxB* باعث افزایش بیان *oprJ* شده و در نتیجه مقاومت چند دارویی افزایش می‌یابد. برای مهار پمپ‌های ترشحی در آزمایشگاه از ترکیبات مهارکننده استفاده می‌شود که یکی از مهم‌ترین این مهارکننده‌ها، کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) می‌باشد (۱۶). این مهارکننده ازجمله مهارکننده‌های پمپ پروتون (PMF) و مهارکننده‌ی پمپ‌های ترشحی خانواده‌ی RND می‌باشد که با عملکرد آن، تجمع داخل سلولی اتوایندیوسرها ایجاد شده و بدین ترتیب در ایجاد بیوفیلم نیز تداخل ایجاد می‌نماید. همان‌طور که گفته شد، CCCP باعث مهار پمپ ترشحی نیز می گردد که در نتیجه، تجمع دارو درون سلول باکتریایی ایجاد شده و اثربخشی آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد (۱۷). لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) و تعیین میزان بیان پمپ ترشحی MexCD-oprJ در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری شهر تهران طی سال‌های ۹۳ تا ۹۴ می‌باشد.

روش بررسی

نحوه‌ی جداسازی و تشخیص آزمایشگاهی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*:

از شهریور ماه ۹۲ تا اسفند سال ۹۳ از بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری نمونه‌گیری به عمل آمد. برای نمونه‌گیری از نمونه‌های سوختگی ابتدا محل زخم بیماران با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد، سپس به وسیله‌ی یک سواب استریل نمونه‌گیری به عمل آمد و سواب‌ها داخل محیط انتقالی استوارت قرار گرفته و سریعا به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شدند. سپس بر روی محیط‌های سیتریماید آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند. محیط‌های کشت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و بعد از این مدت کلنی‌های رشد یافته جهت انجام تست‌های تشخیصی و افتراقی از نظر وجود باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند (۱۸).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن: حساسیت ۱۰۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* بر اساس روش دیسک دیفیوژن و طبق دستورالعمل های CLSI انجام گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفپیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، تیکارسیلین (۷۵ میکروگرم)، پیپراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۱۰/ میکروگرم ۱۰۰)، دوری پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کلیستین (۱۰ میکروگرم) از شرکت Mast تهیه گردید. از سویه‌ی استاندارد ATCC27853 *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان سویه‌ی کنترل کیفی استفاده شد (۱۹).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC): حساسیت ۱۰۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* بر اساس حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) با استفاده از روش میکرودایلوشن براث برای آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، ایمی پنم و مروپنم تعیین گردید. سویه‌ی استاندارد ATCC27853 *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان سویه‌ی کنترل مثبت در نظر گرفته شد (۲۰).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) سیپروفلوکساسین به‌همراه CCCP: حساسیت ۱۰۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* بر اساس حداقل غلظت مهار کننده از رشد (MIC) با استفاده از روش میکرودایلوشن براث برای تعیین حساسیت نسبت به مهارکننده‌ی CCCP تعیین گردید. در این مطالعه از سیپروفلوکساسین به تنهایی و سیپروفلوکساسین به‌همراه رقت نهایی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر CCCP استفاده گردید. سویه‌های استاندارد PAO1 (تهیه شده از گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) و ATCC27853 *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان سویه‌های کنترل استفاده شد (۲۱).

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از کیت RNX (شرکت سیناژن CAT. NO.:RN7713c) انجام گردید. برای بررسی RNA استخراج شده از لحاظ کمی، کلیه نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ (WPA Biowave II Nanospectrophotometer) از لحاظ مقدار و نسبت ۲۸۰/۲۶۰ و ۲۶۰/۲۳۰ بررسی شدند. برای تیمار RNA استخراج شده از آنزیم DNase شرکت Fermentase استفاده گردید و سپس سنتز cDNA با استفاده کیت شرکت تاکارا (Cat.#RRO37Q) انجام شد.

انجام RT-PCR: RT-PCR با استفاده از Master-Mix2x شرکت سیناکلون که شامل ۰/۴ میلی‌مول از هر dNTP،۳ میلی‌مول از MgCl2، ۰/۰۸ واحد از آنزیم Taq پلیمراز، ۱ میکرولیتر از پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر از پرایمر Reverse با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲ میکرولیتر از cDNA بود، انجام گرفت. توالی پرایمرها برای *MexD*-F، CTCGAGCTATACGTGCCTAAC و *MexD*-R، GTCCCTCTTCCCATTTCACG با طول ۷۹ bp و پرایمرهای ژن خانه‌دار *rpsl*-F، GGCGTGCGTTACCACACCGT و *rpsl*-R، GGACGCTTGGCGCCGTACTT با طول ۱۹٤ bp بوده (۲۲)، برنامه‌ی دمایی مورد استفاده برای RT-PCR بدین‌ترتیب بود: Initial denaturation (۵ دقیقه و۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد)،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

Denaturation (۴۵ ثانیه و ۹۴درجه‌ی سانتی‌گراد)، Anealing (۴۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Extention (۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Final extention (۵ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) که برای ۳۶ چرخه انجام گرفت.

Real-Time PCR: برای بررسی میزان بیان ژن *mexD* از Power SYBR Green PCR Master Mix شرکت (CatNO.4367659,Invitrogen Co, USA) استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده برای RT-PCR مجددا برای Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفت. میکروتیوب‌ها در دستگاه RotorGene6000 متعلق به شرکت Corbette Rsearch قرار گرفت و با برنامه‌ی دمایی Initial Denaturation (۱۰ دقیقه و ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Denaturation (۶۰ ثانیه و ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Anealing (۶۰ ثانیه و ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Extention (۱۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Final extention (۵ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) برای ۴۰ چرخه با دمای ذوب ۷۲ تا ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد اجرا شد. همچنین برای تشخیص سیگنال منتشره از کانال ۴۷۰ تا ۵۸۵ نانومتر این دستگاه استفاده گردید. همچنین به‌عنوان کنترل منفی از تیوبی استفاده شد که حاوی همه‌ی مواد موجود در واکنش به جز cDNA می‌باشد. به جای cDNA به تیوب مربوط به آن DEPC افزوده شد. همه‌ی مراحل روی یخ انجام شد و برای جلوگیری از آلودگی، مراحل تهیه‌ی مخلوط‌ها و نیز مرحله‌ی افزودن cDNA بر روی یخ و در زیر هود لامینار صورت گرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت GeNet (Cat. No. K-3000) انجام گردید و غلظت نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ با استفاده از دستگاه WPA Biowave II Nanospectrophotometer مورد بررسی قرار گرفت.

انجام PCR: برای ژن *nfxB* از Master Mix 2x شرکت سیناکلون (CAT. NO.:PR901638) که شامل ۰/۴ میلی‌مول از هر dNTP،۳ میلی‌مول از MgCl2، ۰/۰۸ واحد از آنزیم Taq پلیمراز بود برای انجام PCR استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده برای ژن *nfxB* شامل، ژن *nfxB-F*، TGATTTCCCATGACGAGCGACTCA و *nfxB-R*، AGGCCTGGATGATCTGGTTCAGTA (۱۹۸bp) بوده است (۲۲) که توالی پرایمرها با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در Gene Bank (سیستم blast) چک گردید. برای انجام PCR دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی دمایی Initial Denaturation (۵ دقیقه و ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Denaturation (۴۵ ثانیه و ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Anealing (۴۵ ثانیه و ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد)، Extension (۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و Final extension (۵ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) برای ۳۶ چرخه تنظیم شد.

انجام الکتروفورز: محصولات PCR را بر روی ژل آگارز ۱ درصد با بافر Tris-Borate EDTA(TBE) الکتروفورز شده و سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ شد و در نهایت ژل با دستگاه Gel Doc و در طول موج ۲۸۰ نانومتر از نظر وجود باندهای هدف در مقایسه با مارکر مولکولی و کنترل منفی و مثبت بررسی گردید.

انجام Sequencing: پس از انجام PCR، برای تعیین توالی ژن *nfxB* برخی از سویه‌ها به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال شد و سپس نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas 1.45 و Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری: با استفاده از نرم‌افزار Minitab13 و گزینه آماری t-Test و Pearson نتایج مورد بررسی قرار گرفت و P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری گرفته شد.

یافته‌ها

تعیین سن و جنس بیماران: از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی در بیماران سوختگی ۷۴ نمونه متعلق به مردان و ۲۶ نمونه متعلق

www.SID.ir

Archive of SID

به زنان بود. بررسی محدوده‌ی سنی بیماران نشان داد که ٦ درصد بیماران زیر ۱۰ سال، ۳۲ درصد در محدوده‌ی ۱۰ تا ۳۰ سال، ۵۲ درصد در ۳۰ تا ٦۰ سال و ۱۰ درصد بالای ٦۰ سال بودند.

تعیین نتایج آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش دیسک دیفیوژن: درصد مقاومت ۱۰۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* براساس روش دیسک دیفیوژن در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا حاصل از دیسک دیفیوژن

آنتی بیوتیک	کلیستین	آزترونام	پیپراسیلین	سفپیم	تیکارسیلین	سفتازیدیم	آمیکاسین	پیپراسیلین /تازوباکتام	دوری پنم	مروپنم	ایمی پنم	جنتامایسین	سیپروفلوکساسین
درصد مقاومت در بیماران سوختگی	۰	۹۰	۹۰	۹۳	۹۸	۷۵	۹۱	۸۲	۹٤	۹۵	۹۵	۹۵	۹٤

بر طبق نتایج به‌دست آمده از روش دیسک دیفیوژن، بیشترین میزان مقاومت نسبت به تیکارسیلین (۹۸ درصد)، ایمی‌پنم، مروپنم، جنتامایسین (۹۵ درصد)، دوری پنم و سیپروفلوکساسین (۹٤ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک کلیستین با (۱۰۰ درصد) حساسیت می‌باشد. در این مطالعه (۹۵ درصد) سویه‌ها MDR بودند.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) در ۱۰۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا*: از مجموع ۱۰۰ ایزوله‌ی تحت بررسی، ۹۰ درصد از نمونه‌ها مقاوم به مروپنم و ایمی پنم، ۷۲ درصد مقاوم به سفتازیدیم و ۹٦ درصد مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. نتایج MIC در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: نتایج حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) بر روی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

آنتی بیوتیک	نتایج حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد **(MIC)** بر روی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* (تعداد)							
	۲>(µg/ ml)	۴(µg/ ml)	۸(µg/ ml)	۱۶(µg/ ml)	۳۲(µg/ ml)	۶۴(µg/ ml)	۱۲۸(µg/ ml)	۲۵۶(µg/ ml)
سیپروفلوکساسین	۴	۱	۶	۲۰	۳۹	۱۹	۷	۴
سفتازیدیم	۸	۶	۳	۳	۰	۲	۶	۶۴
ایمی‌پنم	۳	۷	۲۴	۷	۵	۲	۲۸	۳۴
مروپنم	۲	۸	۸	۱۵	۱۹	۲۲	۲۲	۴

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (**MIC**) سیپروفلوکساسین به‌همراه و بدون مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون **(CCCP)** در ۱۰۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا*: از مجموع ۱۰۰ ایزوله‌ی تحت بررسی، تنها ۱۶ درصد ایزوله‌ها حساسیت به مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون را نشان دادند و نتایج تست MIC آن‌ها با مهارکننده کاهش بیش از چهار برابری نسبت به نتایج تست MIC بدون وجود مهارکننده را نشان داد (جدول ۳).

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

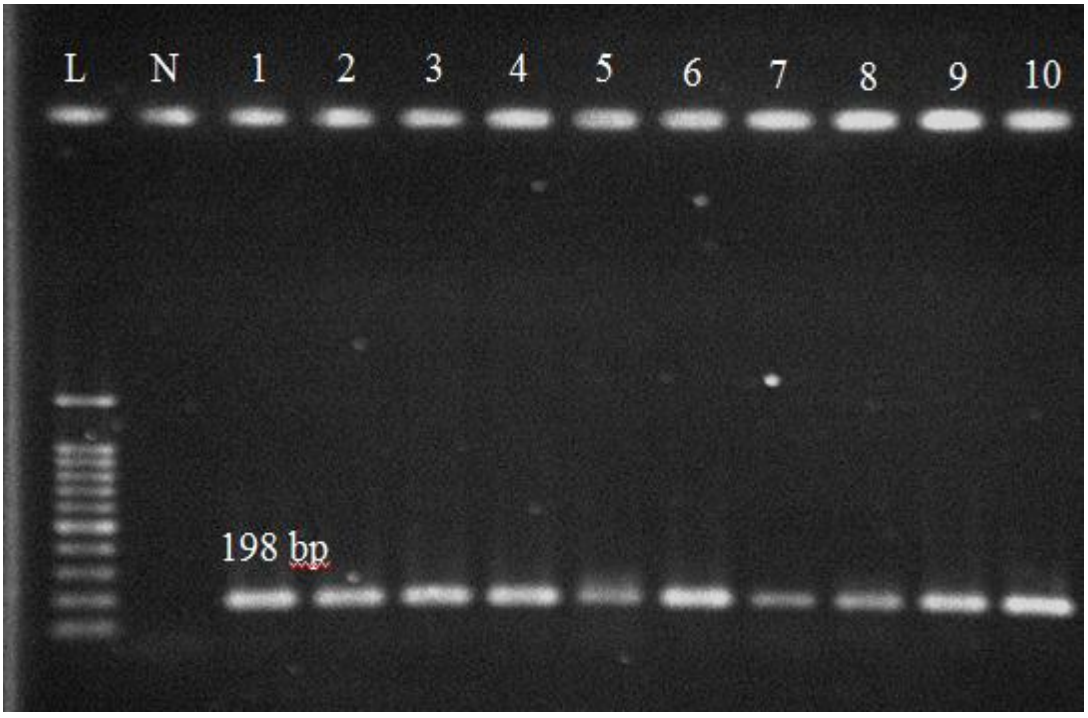
Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

جدول ۳: اثر مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) روی MIC سیپروفلوکساسین در ۱۰۰ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا

میزان کاهش چند برابری MIC سیپروفلوکساسین همراه با CCCP	تعداد ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*
۰	۴۵
۲	۳۹
۴	۵
۸	۶
۱۶	۳
۳۲	۲
۶۴	۰
۱۲۸	۰
۲۵۶	۰

نتایج Real-Time PCR: برای تعیین این که آیا القای بیان پمپ ترشحی MexCD-OprJ باعث مقاومت به فلوروکینولون‌ها شده بود یا نه، میزان بیان ژن *mexD* در این ۱۶ ایزوله با روش Real-Time RT-PCR مورد بررسی قرار داده شد. نتایج Real-Time RT-PCR نشان داد که میزان بیان پمپ MexD در سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها دارای طیف وسیعی از بیان (۰/۲۶ تا ۱۵/۳۴) بود که به‌طور میانگین ۴/۱ افزایش بیان این ژن محاسبه گردید.

فراوانی ژن *nfxB* با استفاده از روش **PCR :** از ۱۰۰ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا*، تمامی سویه‌ها دارای ژن *nfxB* بودند (شکل ۱).



شکل ۱: ژن nfx-B N: کنترل منفی، L: Ladder، ۱۰-۱: نمونه‌های مجهول

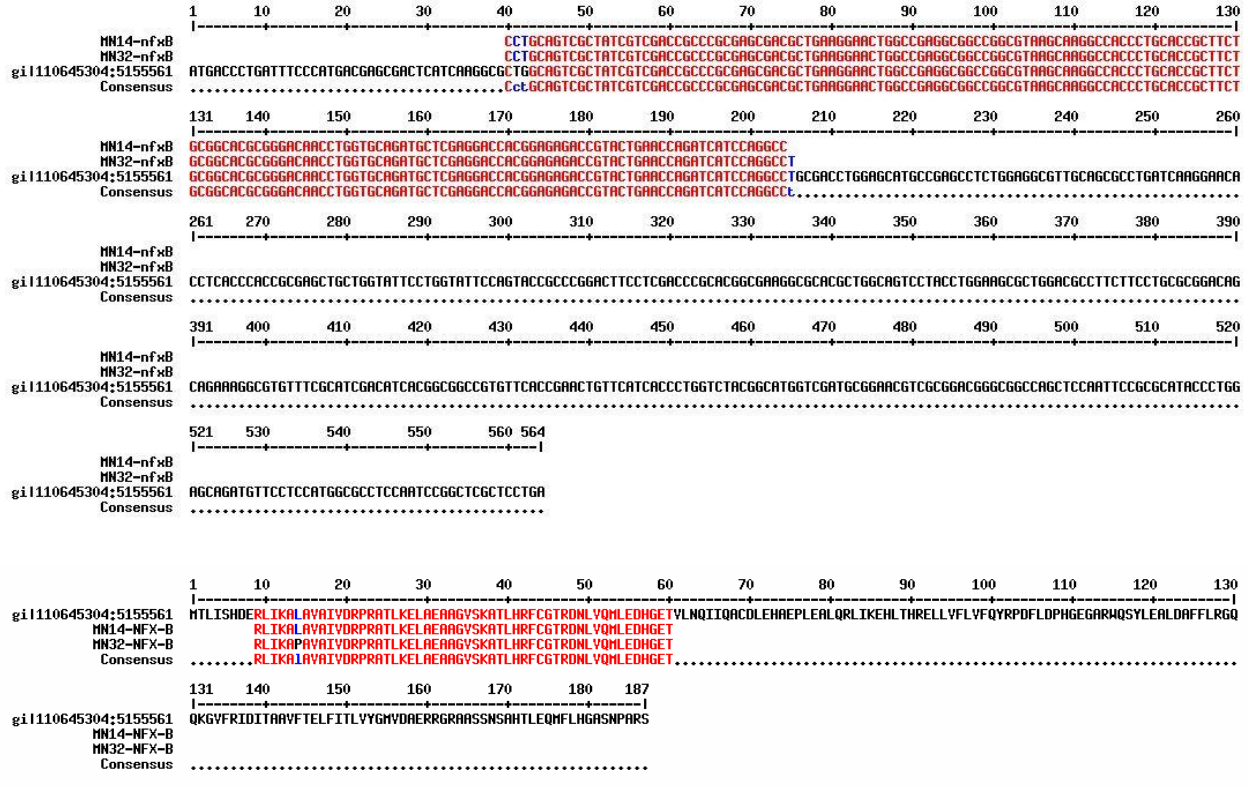
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

نتایج حاصل از انجام تعیین توالی ژن *nfxB*: محصولات PCR نمونه‌ها برای تعیین توالی به Bioneer کشور کره جنوبی فرستاده شد و نتایج با نرم‌افزار Chromas1.45 مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از Blast در NCBI تایید شد. نتایج حاصل جهش در موقعیت‌های ۴۱ و ۴۲ توالی نوکلئوتیدی را نشان داد که به ترتیب تیمیدین به سیتوزین و گوانین به تیمیدین تبدیل شده که درنتیجه توالی پروتئینی در موقعیت ۱۴ اسید آمینه لوسین را به پرولین تبدیل نموده است. توالی ژن *nfxB* ایزوله جدا شده از بیمارستان مطهری با شماره KU342706 در بانک ژن ثبت شده است (شکل ۲).

شکل ۲: توالی و کروماتوگرام ژن nfxB و توالی پروتئینی ژن nfxB



بحث

سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی و عامل اصلی مرگ و میر در مبتلایان به ضعف سیستم ایمنی مانند ایدز، نقص ژنتیکی مثل سیستیک فیبروزیس (CF)، بیماران بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) و مبتلایان به سوختگی مطرح است (۲۴و ۲۳). ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های مختلف از جمله بخش سوختگی رو به افزایش می‌باشد. این مطالعه در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به روش دیسک دیفیوژن، مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربردی مثل تیکارسیلین، ایمی پنم، مروپنم، جنتامایسین، دوری پنم و سیپروفلوکساسین را نشان داد و کلیستین به‌عنوان اثر بخش‌ترین آنتی بیوتیک معرفی شد. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که با مصرف غیر استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های مختلف درمانی، ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* MDR نسبت به طیف

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌اند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط وحدانی در تهران انجام گرفت، مقاومت بالای ۹۰ درصد نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم، تیکارسیلین و توبرامایسین، مقاومت به سیپروفلوکساسین ۸۸ درصد، پیپراسیلین ۸۹ درصد، سفپیم ۸۷ درصد، پیپراسیلین/تازوباکتام ۸۶ درصد، آزترئونام ۸۴ درصد و سفتازیدیم ۸۱ درصد و حساسیت ۱۰۰ درصد نسبت به کلیستین مشاهده شد (۲۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط سلیمی در تهران انجام شد، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تیکارسیلین (۹۹ درصد)، ایمی‌پنم، مروپنم و آزترونام (۹۶ درصد) گزارش شد (۲۶). نتایج این مطالعات با توجه به این که روی بیماران سوختگی صورت گرفته و از لحاظ منطقه‌ی جغرافیایی مشابه است به‌طور کامل با نتایج حاصل از بررسی ما مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که توسط پونت بات و همکاران در سال ۲۰۱۵ در هند انجام گرفت مقاومت به جنتامایسین ۸۴ درصد، سفتازیدیم ۷۶/۷۹ درصد، توبرامایسین ۷۵ درصد، آمیکاسین ۷۳/۲ درصد، سیپروفلوکساسین ۷۱/۴ درصد و ایمی پنم ۶۱ درصد در بیماران سوختگی گزارش شد (۲۷). مقایسه‌ی میزان مقاومت در این مطالعات نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک کلیستین به‌عنوان بهترین آنتی‌بیوتیک جهت درمان ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مطرح است. کاهش بیش از چهار برابری نتایج MIC در حضور مهارکننده به همراه سیپروفلوکساسین نسبت به سیپروفلوکساسین به تنهایی به‌معنای اثر مهارکننده روی پمپ‌های ترشحی می باشد که اثر مهارکننده در ۱۶ ایزوله (۱۶ درصد) دیده شده است. در مطالعه‌ی مشابهی که آدابی در تهران در سال ۲۰۱۵ انجام داد، ۸ درصد ایزوله، کاهش ۴ برابری نتایج MIC در حضور مهارکننده را نشان دادند (۲۱). در مطالعه‌ی موروگان در سال ۲۰۱۵ در هند در ۱۰ درصد ایزوله‌ها اثر مهارکننده دیده شد (۲۳). در مطالعه‌ی دیگری از همین کشور که توسط چودهوری در سال ۲۰۱۵ انجام گرفت، MIC_{50} سیپروفلوکساسین بدون CCCP و ۳۲ بوده که به همراه CCCP به ۸ کاهش یافته است (۲۸). مهارکننده‌ی کربونیل سیانید ۳- کلروفنیل هیدرازون با مهار پمپ پروتون، باعث اختلال در گرادیانت غشایی شده و به این ترتیب عملکرد پمپ ترشحی را مختل نموده و باعث تجمع آنتی‌بیوتیک درون سلول باکتریایی می‌شود و در نتیجه اثر بخشی آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش می‌دهد (۳۰و ۲۹). برای تعیین اینکه آیا افزایش بیان پمپ MexCD-oprJ در مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش دارد یا نه، از روش Real-Time-PCR و مقایسه‌ی نتایج نسبت به سویه‌ی استاندارد *P.auroginosa* PAO1 استفاده شد و مشخص شد، تمامی ۱۶ سویه مورد بررسی افزایش بیان ۱۵/۳۶-۰/۲۶ برابری را داشتند که به‌طور میانگین افزایش ۴/۱ برابری را نسبت به سویه‌ی استاندارد *P.auroginosa* PAO1 نشان می‌دهند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در تهران توسط توحید پور انجام گرفت ۱۱/۱ درصد نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* افزایش بیان این پمپ ترشحی را نشان دادند (۳۱). در پژوهش پورسل در سال ۲۰۱۳ در کانادا افزایش بیان این پمپ بر اساس نتایج Real-Time PCR، ۴ درصد گزارش شد (۱۳). پمپ ترشحی MexCD-oprJ در سویه‌های تیپ وحشی *سودوموناس آئروژینوزا* بیان نمی‌شود و تحت شرایطی افزایش بیان پیدا می‌کند که در نتیجه باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌گردد. از جمله‌ی این شرایط مصرف طولانی مدت فلوروکینولون‌ها می‌باشد که باعث القای موتاسیون در ژن *nfxB* شده و بدین‌ترتیب با مهار رپرسور تولیدی این ژن، بیان *mexCD-oprJ* افزایش می‌یابد (۳۲) لینارس و سانچز اولین افرادی بودند که افزایش بیان پمپ ترشحی MexCD-oprJ را مرتبط با موتانت‌های *nfxB* تشخیص دادند (۳۳). در این مطالعه نیز با استفاده از روش PCR و Sequencing به بررسی موتاسیون‌های ژن *nfxB* پرداخته و مشخص شد در موقعیت ۱۴ توالی پروتئینی اسید آمینه‌ی لوسین تبدیل به پرولین شده است. در مطالعه‌ای که

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

توسط واعظ و همکاران در سال ۲۰۱۳ در اصفهان انجام گرفت، ۱۲ موتاسیون نقطه‌ای در توالی *nfxB* شناسایی شد که اکثرا تغییر آدنین به سیتوزین در موقعیت‌های ۳۷۱ و ۳۷۲ بود و یک موتاسیون missense هم در کدون ۱۲۴ دیده شد که باعث تغییر گلوتامات به آلانین گشته بود (۳۴). در مطالعه‌ی جینوت در سال ۲۰۰۸ در فرانسه بررسی توالی *nfxB* جهت شناسایی موتاسیون‌ها نشان داد که آلانین در موقعیت ۳۸ تبدیل به والین شده است، که این موقعیت‌ها در جایگاه اتصال به DNA پروتئین رپرسور تولیدی این ژن قرار گرفته، بنابراین این موتانت‌ها توانایی اتصال به DNA را از دست داده و بیان ژن *mexCD-oprJ* افزایش می‌یابد و در نتیجه باعث افلاکس فعال آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص فلوروکینولون‌ها می‌شود که از داروهای بسیار مهم تجویزی در عفونت‌های سودوموناسی می‌باشد (۳۳).

نتیجه گیری

میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بسیار بالا بوده و لازم است پزشکان در تجویز دارو دقت لازم را مبذول داشته و نمونه‌های مورد نظر را جهت انجام تست‌های آنتی‌بیوگرام به آزمایشگاه ارسال نمایند تا بهترین گزینه‌ی دارویی برای بیماران تجویز گردد. فلوروکینولون‌ها ازجمله آنتی بیوتیک‌های بسیار کاربردی در عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد و مصرف طولانی مدت این دارو باعث القای موتاسیون در ژن *nfxB* شده و در نتیجه باعث افزایش بیان پمپ ترشحی *mexCD-oprJ* می‌گردد و با کاهش اثر آنتی‌بیوتیک‌ها گزینه‌های درمانی را با محدودیت جدی مواجه می‌نماید. پس استفاده از مهارکننده‌ی پمپ‌های ترشحی از جمله کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون با ایجاد اختلال در عملکرد این پمپ‌ها باعث افزایش اثربخشی آنتی‌بیوتیک می‌گردد.

تقدیر و تشکر

مقاله‌ی حاضر حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد ثبت ۱۳۲۱۷ می‌باشد.

References

1- Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19: 403-34.

2- Yazdi MMK, Ghalavand Z, Yazdi AK, et al. Antibiotic resistante pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with otitis in Tehran hospitals. *Int J Analytic Pharma Biomed Sci*. 2015; 9: 50-6.

3- Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Hashemi A, Zamani F, Rostami A, Mozafari M. Silver-and fluoride-containing mesoporous bioactive glasses versus commonly used antibiotics: Activity against multidrug-resistant bacterial strains isolated from patients with burns. *Burns*. 2015; 42: 131-40.

4- Washington JA. Laboratory procedures in clinical microbiology: Springer Science & Business Media; 2012.

5- Vala MH, Hallajzadeh M, Hashemi A, et al. Detection of ambler class A, B and D ß-lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Ann Burns Fire Disasters*. 2014; 27: 8-13.

6- Jafari M, Fallah F, Borhan RS, et al. The first

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

report of CMY, aac (6′)-Ib and 16S rRNA methylase genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Arch Pediat Infect Dis.* 2013; 1: 109-12.

7- Ghazi M, Isadyar M, Gachkar L, et al. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of infection in pediatric oncology patients with chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2012; 34: 128-30.

8- Hardie J, Whiley R. The genus *Streptococcus*. The genera of lactic acid bacteria: *Springer*. 1995; 55-124.

9- Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, et al. Detection of metallo-beta-lactamases, extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), outer membrane porins among *Klebsiella Pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in tehran. *J Zanjan Univ Med Sci Journal*. 2015; 23: 89-102.

10- Gholipourmalekabadi M, Bandehpour M, Mozafari M, et al. Decellularized human amniotic membrane: more is needed for an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant bacteria isolated from burn patients. *Burns*. 2015; 41: 1488-97.

11- Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Global Spread of New Delhi mettallo-beta-lactamase (NDM-1). *Arch Clin Infect Dis*. 2012; 6: 171-7.

12- Morita Y, Murata T, Mima T, et al. Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 991-4.

13- Purssell A, Poole K. Functional characterization of the NfxB repressor of the mexCD–oprJ multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2013; 159: 2058-73.

14- Poole K. *Pseudomonas aeruginosa* efflux pumps. Microbial Efflux Pumps: Current Research. 2013: 175-206.

15- Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001; 3: 255-64.

16- Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*. 2013; 4: 223-9.

17- Ikonomidis A, Tsakris A, Kanellopoulou M, Maniatis A, Pournaras S. Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide ‐ m ‐ chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Lett Appl Microbiol*. 2008; 47: 298-302.

18- Hashemi A, Shams S, Barati M, Samedani A. Antibacterial effects of methanolic extracts of *Zataria multiflora, Myrtus communis* and *Peganum harmala* on *Pseudomonas aeruginosa* producing ESBL. *J Arak Univ Med Sci*. 2011; 14: 104-12.

19- Fallah F, Borhan RS, Gholinejad Z, Zahirnia Z, Adabiyan S, Tabrizi MS. Detection of blaIMP and blaVIM metallo-beta-lactamases genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

wound of burnt patients in Tehran Shahid Motahari hospital during 2011, Iran. *Int J Burns Trauma*. 2013; 1: 7-21.

20- Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS. Detection of TEM, SHV and PER type extended-spectrum ß-lactamase genes among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2008; 11: 104-11.

21- Adabi M, Talebi-Taher M, Arbabi L, et al. Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor. *Infect Chemother*. 2015; 47: 98-104.

22- Purssell A, Fruci M, Mikalauskas A, Gilmour C, Poole K. EsrC, an envelope stress ‑ regulated repressor of the mexCD ‑ oprJ multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ microbiol*. 2015; 17: 186-98.

23- Murugan N, Malathi J, Rs S, Hn M. Evaiuation of a method for detection of both metallo betalactamase (MBL) and efflux production using carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) ± combination method among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015; 8: 185-89.

24- Fallah F, Taherpour A, Borhan R, Hashemi A, Habibi M, Sajadi N. Evaluation of *Zataria Multiflora Boiss* and *Carum copticum* antibacterial activity on IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Burns Fire Disasters*. 2013; 26: 193-8.

25- Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypic screening of extended-spectrum ss-lactamase and metallo-ss-lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012; 25: 78-81.

26- Salimi F, Eftekhar F. Prevalence of blAbstractP and blaVIM gene carriage in metallo-\ beta-lactamase-producing burn isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran. *Turk J Med Sci*. 2014; 44: 511-4.

27- Bhatt P, Rathi KR, Hazra S, Sharma A, Shete V. Prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in burn patients at a tertiary care centre. *Indian J Burns*. 2015; 23: 56-59.

28- Choudhury D, Talukdar AD, Maurya A, et al. Contribution of efflux pumps in fluroquinolone resistance in multi-drug resistant nosocomial isolates of *Pseudomanas aeruginosa* from a tertiary referral hospital in north east India. *Int J Med Microbiol*. 2015; 33: 84-6.

29- Xu L, Liu M, Zhang Y, Qi Q, Li Y. Effects of antibiotics plus efflux pump inhibitors on mutant selection window of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2014; 94: 2055-8.

30- Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, Goudarzi H, Hallajzadeh M. Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β-naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

imipenem in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8:e19048.

31- Tohidpour A, Najar Peerayeh S, Najafi S. Detection of DNA gyrase mutation and multidrug efflux pumps hyperactivity in ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol Infec Dis*. 2013; 1: 1-7.

32- Masecar BL, Celesk RA, Robillard NJ. Analysis of acquired ciprofloxacin resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; 34: 281-6.

33- Jeannot K, Elsen S, Köhler T, Attree I, Van Delden C, Plésiat P. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. Antimicrob Agents Ch. 2008; 52: 2455-62.

34- Vaez H, Faghri J, Isfahani BN, et al. Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals. *Adv Bjomed Res.* 2014; 3: 117.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone Effect and Efflux Pump Expression Level of mexCD-oprJ among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Shahid Motahari Hospital in Tehran during 2014-2015

Tarashi S[1], Goudarzi H[1], Hashemi A[1], Yousefi Nojokambri N[1], Sadreddin Amin M[1], Taki E[1], Satarzadeh Tabrizi M[2]

[1]Dept.of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2]Shahid Motahari Burning Hospital,Tehran,Iran

Coressponding Author: Hashemi A, Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***E-mail*:** hashemi1388@yahoo.com

Received: 30 Jan 2016 **Accepted:** 30 Jun 2016

Background and Objective: Efflux pumps are one of the major resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* that inhibit the accumulation of antibiotics in bacterial cells. The aim of this study was determining the effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone (CCCP) and detecting the overexpression of pump MexCD-oprJ in *P. aeruginosa* isolated from burn patients in Shahid Motahari hospital during 2014 and 2015.

Materials and Methods: This descriptive study was performed on 100 *P. aeruginosa* isolates from burn patients in Shahid Motahari hospital. Antibiotic susceptibility tests were performed by Kirby-Bauer disc diffusion and broth microdilution methods according to the CLSI guidelines. The effect of CCCP was determined using the broth microdilution method. The expression levels of MexD-oprJ (an efflux pump) was evaluated by Real-Time PCR and finally detection of *nfxB* mutations was carried out by PCR and sequencing techniques.

Results: Antibiogram for 100 *P. aeruginosa* showed maximum susceptibility and resistance to colistin (100%) and ticarcilin (98%), respectively. The inhibitory effect of CCCP was apparently seen in 16 isolates. Real-time PCR results for these strains showed overexpression in range of 0.26-15.34 (mean: 4/1). The PCR and sequencing techniques showed mutations that converts lucin to prolin in position 14 of the protein sequence.

Conclusion: The increase in expression level of efflux pump MexCD-oprJ shows the prevalence of *nfxB* mutants in burn wound infections. Therefore, use of carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone (CCCP) can help disrupt the function of efflux pumps and improve the effects of antibiotics.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone, Antibiotic resistance, MexCD-oprJ, Real time PCR

Downloaded from zums.ac.ir at 14:37 IRST on Wednesday December 28th 2016

www.SID.ir