

Molecular Investigation of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes of TEM, PER, SHV, CTX- and GES in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Evaluation of Its Relationship with Antimicrobial Resistance

Samaneh Malekshahi¹, Raziieh Nazari², Seyed-Hasan Adeli³

1. Master, Department of Microbiology, Qo.C, Islamic Azad University, Qom, Iran. ORCID ID: 0009-0005-2246-5946

2. Associate Professor, Department of Microbiology, Qo.C, Islamic Azad University, Qom, Iran. (Corresponding Author), Email: Raziieh.nazari@iau.ac.ir Tel: +98-25-37780001, 09902349712. ORCID ID: 0000-0002-3487-1416

3. Associate Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Medical University of Qom, Qom, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5970-7551

ABSTRACT

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* causes numerous therapeutic problems in patients due to the presence of various effective factors in antibiotic resistance such as beta-lactamase enzymes. The aim of this study was to investigate antibiotic resistance pattern in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and the frequency of beta-lactamase genes of TEM, PER, SHV, CTX-M and GES using PCR.

Materials and Methods: The antibiotic resistance pattern of 150 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were determined by the Kirby-Bauer method according to CLSI standards. Then, the frequency of beta-lactamase genes of TEM, PER, SHV, CTX-M and GES in the isolates was evaluated using PCR method. The results were analyzed with SPSS software and Pearson's chi-squared test.

Results: The finding of this study showed that, 52% (78 isolates) of *Pseudomonas aeruginosa* isolates were recovered from tracheal aspirate from ICU wards. Among 150 isolates, the lowest rate of resistance was seen against cefepime (38%) and amikacin (42%). Also, most isolates (78%) showed a minimum inhibitory concentration of ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$ for ceftazidim. The results of genotypic analysis of extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant isolates showed that the CTX-M gene had the highest frequency and the GES gene had the lowest frequency.

Conclusion: The results of the present study showed that the CTX-M gene seems to play a greater role in antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* compared to other beta-lactamase genes studied, because the distribution of this gene in resistant isolates was higher than other genes.

Keywords: Antimicrobial resistance, Beta-lactamase gene, PCR, *Pseudomonas aeruginosa*.

Received: July 13, 2025

Accepted: Dec 14, 2025

How to cite the article: Samaneh Malekshahi, Raziieh Nazari, Seyed-Hasan Adeli. Molecular Investigation of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes of TEM, PER, SHV, CTX- and GES in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Evaluation of Its Relationship with Antimicrobial Resistance. SJKU 2025;30(5):107-118

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی مولکولی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف CTX-M، SHV، PER، TEM و GES در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی ارتباط آن با مقاومت‌های ضد میکروبی

سمانه ملک‌شاهی^۱، راضیه نظری^۲، سید حسن عادل^۳

۱. کارشناس ارشد. گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. کد ارکید ۵۹۴۶-۲۲۴۶-۰۰۵-۰۰۰۹
۲. دانشیار. گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. (نویسنده مسئول). پست الکترونیک: Razieh.nazari@iau.ac.ir، تلفن: ۰۲۵۳۷۷۸۰۰۰۱
۳. دانشیار گروه پزشکی داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران. کد ارکید ۷۵۵۱-۵۹۷۰-۰۰۰۱-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا به علت دارا بودن انواعی از عوامل مؤثر در مقاومت آنتی‌بیوتیکی مانند آتریم‌های بتالاکتامازی، مشکلات درمانی متعددی را در بیماران ایجاد می‌کند این مطالعه با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا و فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی CTX-M، SHV، PER، TEM و GES با استفاده از PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۵۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا با روش Kirby-bauer طبق معیارهای استاندارد آزمایشگاهی بالینی CLSI تعیین گردید. سپس فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی CTX-M، SHV، PER، TEM و GES در جدایه‌ها با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS و آزمون پیرسون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۵۲٪ (۷۸ جدایه) جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا از ترشحات تنفسی از بخش ICU به دست آمد. در میان ۱۵۰ جدایه، پایین‌ترین میزان مقاومت در برابر سفپیم (۳۸٪) و آمیکاسین (۴۲٪) مشاهده شد. همچنین اغلب جدایه‌ها (۷۸٪)، حداقل غلظت بازدارنده ≥ 512 میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به سفتازیدیم را نشان دادند. نتایج بررسی ژنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در جدایه‌های مقاوم به سفتازیدیم نشان داد که ژن CTX-M بیشترین فراوانی و ژن GES کمترین فراوانی را دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که به نظر می‌رسد ژن CTX-M نقش بیشتری در مقایسه با سایر ژن‌های بتالاکتامازی مورد بررسی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا دارد، زیرا انتشار این ژن در جدایه‌های مقاوم بیشتر از سایر ژن‌ها بوده است.

کلمات کلیدی: ژن بتالاکتاماز، سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت ضد میکروبی، PCR

وصول مقاله: ۱۴۰۴/۰۴/۲۲ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳

مقدمه

امروزه عفونت‌های بیمارستانی به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای عوامل ایجادکننده آن‌ها به‌عنوان یکی از علل مهم مرگ‌ومیر و افزایش زمان بستری در بیماران مطرح می‌باشند. عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب گروه ESKAPE (انتروکوکوس فاسیوم، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اسیتوباکتریومانی، سودوموناس آئروژینوزا و اتروباکتر) در محیط بیمارستان در افراد با سیستم ایمنی ضعیف با ایجاد انواع عفونت‌های بیمارستانی، مشکلات متعددی را در حوزه سلامت ایجاد می‌نمایند (۱). اعضای این گروه توسط انجمن بیماری‌های عفونی آمریکا به‌عنوان یک تهدید نگران‌کننده برای سلامت عمومی جهان در ارتباط با مقاومت ضد میکروبی شناخته شده‌اند (۲). در میان این عوامل سودوموناس آئروژینوزا با ایجاد انواع عفونت‌های بیمارستانی مانند پنومونی‌های منتقله از طریق وسایل کمک‌کننده دستگاه تنفسی، باکتری‌می، عفونت زخم، مجاری ادراری و مننژیت اهمیت زیادی دارد (۳). این باکتری به‌طور وسیع در طبیعت و محیط اطراف پراکنده بوده و می‌تواند مدت‌زمان زیادی بر روی سطوح مختلف در محیط‌های بیمارستانی حتی سطوح خشک زنده بماند و کنترل انتشار آن را با مشکل مواجه سازد (۴). در سال‌های اخیر به دلیل مصرف بالای آنتی‌بیوتیک‌ها در دنیا، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی متعدد در سراسر جهان به‌طور فزاینده افزایش یافته است (۵). این باکتری با انواع مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی مانند کاهش نفوذپذیری غشاء سلول، تغییر ساختمان مولکول هدف دارو، تولید آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک، پمپ‌های افلاکس و توانایی تشکیل بیوفیلم قوی معضلات بسیاری را در حوزه درمان ایجاد کرده است (۶). در این میان تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی نقش مهمی در ایجاد مقاومت جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارند و به‌عنوان عامل دفاعی اصلی آن‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب

می‌شوند (۷). این آنزیم‌ها به‌وسیله ژن‌های متفاوتی که روی کروموزوم و یا پلاسمید قرار دارند کد می‌شوند و با باز کردن حلقه بتالاکتام آن را غیرفعال می‌سازند. بتالاکتامازها طبق تقسیم‌بندی آمبلر بر اساس تشابه توالی اسیدآمین به چهار کلاس A تا D تقسیم‌بندی می‌شوند که C، D و A سرین بتالاکتاماز بوده، درحالی‌که نوع B متالوبتالاکتاماز است (۸). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL Extended-Spectrum Beta-Lactamase) از بتالاکتامازهای کلاس A هستند که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها، پنی‌سیلین و مونوباکتام‌ها را دارند اما قادر به هیدرولیز کارباپنم‌ها نمی‌باشند و عمدتاً توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز از جمله اسید کلاولانیک، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند (۹). در این گروه انواعی از ژن‌ها مانند SHV، TEM، GES، PER، CTX-M و غیره حضور دارد که از سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده‌اند (۱۰). این ژن‌ها از نظر اپیدمیولوژیک در سراسر جهان پراکنده‌اند و در بروز مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی خصوصاً سودوموناس آئروژینوزا نقش دارند (۱۱). با توجه به شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف در سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اهمیت بتالاکتامازها در ایجاد مقاومت‌های دارویی در این باکتری و انتشار ژن‌های آن در مناطق مختلف، لذا در تحقیق حاضر میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی نوع TEM، PER، SHV، CTX-M و GES با استفاده از واکنش PCR در سودوموناس آئروژینوزا‌های جداشده از بیمارستان‌های شهر قم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جدایه‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی از آبان ماه سال ۱۴۰۲ تا اردیبهشت ۱۴۰۳، تعداد ۱۵۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی شامل ترشحات تنفسی، ادرار، مدفوع، زخم سوختگی، خون و زخم‌های جراحی از

فراوانی مولکولی ژن‌های TEM، GES، CTX-M، PER و SHV با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق حاضر جهت استخراج DNA از جدایه‌ها از روش جوشاندن استفاده شد (۱۴). DNA های استخراج شده جهت بررسی کیفی با کمک ژل آگاروز الکتروفورز گردید و جهت بررسی کمی با دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, USA) غلظت آن‌ها به‌طور دقیق مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). در مرحله بعد پرایمر های اختصاصی هر یک از ژن‌های مذکور با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner و پایگاه اطلاعات ژنی (National Center for Biotechnology and Information, NCBI) طراحی (جدول ۱) و بهترین توالی جهت استفاده در واکنش PCR برای سنتز به شرکت توپاززن ارسال گردید. واکنش PCR جهت بررسی ژن‌های مورد نظر با استفاده از ۱۳/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناکلون، ایران)، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس اختصاصی هر ژن، ۱۰۰ نانوگرم ژنوم جدایه‌ها و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این تحقیق از سویه‌های استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 7881 واجد ژن‌های TEM، GES، CTX-M و SHV و سودوموناس آئروژینوزا KOAS واجد ژن PER به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR استفاده شد. سپس واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) با برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر اختصاصی ژن TEM در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر اختصاصی ژن SHV در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر اختصاصی ژن GES در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر اختصاصی ژن PER در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و اتصال پرایمر اختصاصی ژن CTX-M در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، تکثیر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ سیکل و تکثیر نهایی به

بیمارانی که ۷۲ ساعت از زمان بستری‌شان در بیمارستان‌های شهر قم گذشته بود و احتمال ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی در آن‌ها وجود داشت، جداسازی گردید. تهیه نمونه‌های این پژوهش، مورد تأیید کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم با کد IR.IAU.QOM.REC.1402.188 قرار گرفت. تشخیص نهایی سودوموناس آئروژینوزا با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی متداول میکروبی مانند کاتالاز، اکسیداز، رشد در محیط‌های کشت سیمون سترات، TSI، MR VP و SIM انجام شد (۱۲).

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی: حساسیت جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن Kirby-bauer طبق معیارهای استاندارد آزمایشگاهی بالینی (CLSI 2019) تعیین گردید (۱۳). در این بررسی از ۱۷ دیسک آنتی‌بیوتیکی شامل سفیم (CPM)، سفیتزوکسیم (CZ)، توبراماسین (TO)، پپراسیلین (PIP)، پپراسیلین-تازوباکتام (PTZ)، سپروفلوکساسین (CIP)، جنتاماسین (GM)، سفنازیدیم (CAZ)، مروپنم (MEM)، سفتریاکسون (CRO)، ایمپنم (IMI)، آمیکاسین (AK)، تیکارسیلین (TI)، تیکارسیلین کلولانیک اسید (TCC)، سفوتاکسیم (CTX)، سفنازیدیم کلولانیک اسید (CAC) و آزترونام (ATM)، تهیه شده از شرکت Mast Diagnostics Mast group Ltd. Merseyside, UK) استفاده شد. در این مطالعه، از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان سویه شاهد استفاده شد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم در جدایه‌ها به روش Broth micro dilution با استناد به پروتکل CLSI مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

شناسایی مولکولی جدایه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف: جهت شناسایی مولکولی انواع سودوموناس آئروژینوزا های واجد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از جدایه‌های مقاوم به سفنازیدیم این باکتری استفاده شد و

مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. بافر (سیناکلون، ایران)، بر روی ژل آگاروز یک درصد و در پس از اتمام واکنش PCR جهت بررسی کیفی محصول واکنش، ۵ میکرولیتر از آن به همراه ۵ میکرولیتر لودینگ الکتروفورز گردید. کنار مارکر استاندارد (۱۰۰bp) (سیناکلون، ایران)،

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

نام ژن	(5' - 3') توالی	سایز محصول
TEM-For	ATA AAATTCTTG AAG ACG AAA	۱۰۷۹bp
TEM-Rev	GACAGTTAC CAATGCTTA ATC A	
SHV-For	TGGTTATGCGTT ATA TTCGCC GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	۸۷۰bp
SHV-Rev		
GES-For	ATGCGCTTCATTCACGCAC	
GES-Rev	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	۸۶۰bp
PER-For	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	
PER-Rev	ATGAATGTCATTATA AAAGC	
CTX-M-For	CGCTTTGCGATGTGCAG	۹۷۰bp
CTX-M-Rev	ACCGCGATATCGTTGGT	
		۵۵۰bp

در مجموع از ۱۵۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، ۷۸ جدایه (۵۲٪) از ترشحات تنفسی، ۹ جدایه (۶٪) از ادرار، ۴۳ جدایه (۲۹٪) از زخم سوختگی، ۸ جدایه (۵٪) از خون و ۱۲ جدایه (۸٪) از زخم جراحی به دست آمد. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر سفتریوکسیم ۹۷٪، سفوتاکسیم ۹۵٪ و کمترین میزان مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم کلاولانیک اسید ۳۸٪، سفیم ۳۸٪ وجود دارد. میزان مقاومت جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون ۸۰٪، آزترونام ۷۰٪، جنتامایسین ۶۹٪، سفنازیدیم ۶۷٪، مروپنم ۶۰٪، سیپروفلوکساسین ۶۰٪، پیراسیلین-تازوباکتام ۵۹٪، ایمی پنم ۵۷٪، توبرامایسین ۴۸/۵٪، تیکارسیلین کلاولانیک اسید ۴۸٪، پیراسیلین ۴۵٪، تیکارسیلین ۴۳٪ و آمیکاسین ۴۲٪

نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS و آزمون پیرسون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اختلاف کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در تحقیق حاضر از ۷۴۱ نمونه بالینی جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر قم، ۱۵۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا به دست آمد. تشخیص اولیه به دنبال بررسی ظاهر کلنی و رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت و در ادامه باسیل‌های گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت در محیط‌های افتراقی کشت داده شد. در نهایت جدایه‌ها با اندول منفی، حرکت مثبت، تولید SH2 منفی، سیمون سترات مثبت، متیل رد منفی، VP منفی و TSI K/K با پیگمان سبز-آبی به عنوان سودوموناس آئروژینوزا در نظر گرفته شد.

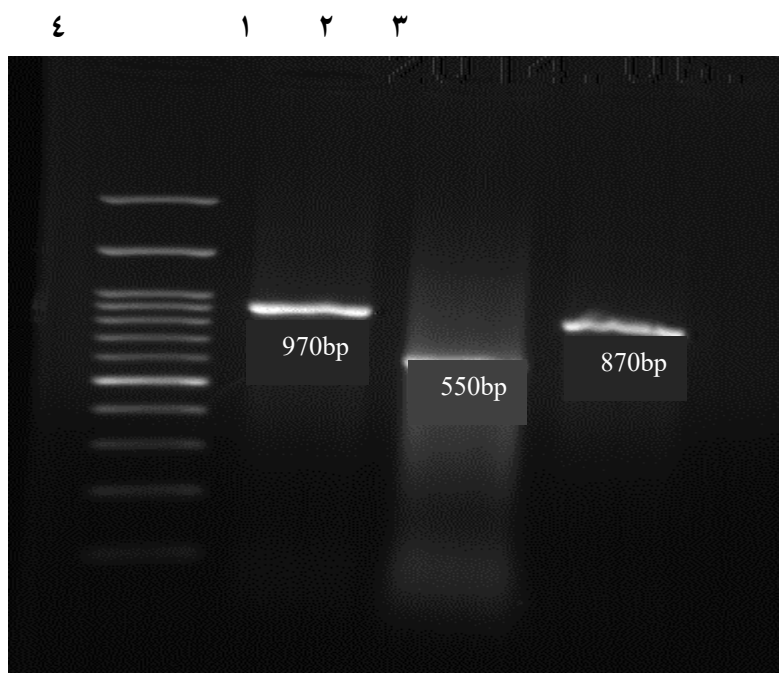
مشاهده گردید (جدول ۲). از مجموع جدایه‌های مورد مطالعه، حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفنازیدیم در ۷۸٪ از جدایه‌ها، $MIC \geq 512$ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

جدول ۲. میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا

درصد مقاومت	آنتی‌بیوتیک
۴۲	آمیکاسین
۷۰	آزترونام
۶۷	سفنازیدیم
۹۷	سفنزوکسیم
۴۳	تیکارسیلین
۳۸	سفپیم
۸۰	سفتریاکسون
۶۹	جنتامایسین
۵۷	ایمی پنم
۹۵	سفوتاکسیم
۶۰	مروپنم
۶۰	سیپروفلوکساسین
۴۵	پیراسیلین
۳۸	سفنازیدیم کلاولانیک اسید
۵۹	پیراسیلین-تازوباکتام
۴۸	تیکارسیلین - کلاولانیک اسید
۴۸/۵	توبرامایسین

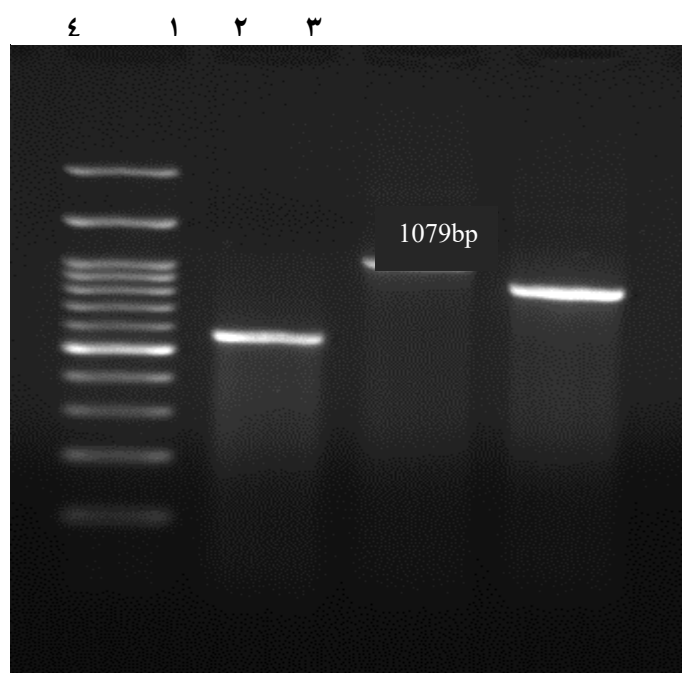
جدایه (۱۸/۸۱٪) دارای ژن CTX-M، ۶ جدایه دارای ژن PER (۵/۹۴٪) و ۱ جدایه (۰/۹۹٪) دارای ژن GES بودند. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که در بین جدایه‌های مقاوم به سفنازیدیم ژن CTX-M بیشترین فراوانی و ژن GES کمترین فراوانی را داشته است. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که بین مقاومت جدایه‌ها به سفالوسپورین‌ها و ژن‌های بتالاکتامازی ارتباط معناداری وجود دارد ($P < 0.05$).

در الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش PCR، به دنبال تکثیر ژن PER باند ۹۷۰ جفت بازی، ژن CTX-M باند ۵۵۰ جفت بازی، ژن SHV باند ۸۷۰ جفت بازی (شکل ۱)، ژن TEM باند ۱۰۷۹ جفت بازی و ژن GES باند ۸۶۰ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۲). نتایج شناسایی مولکولی ژن بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف کلاس A در ۱۰۱ جدایه مقاوم به سفنازیدیم نشان داد که ۵ جدایه (۴/۹۵٪) دارای ژن TEM، ۴ جدایه (۳/۹۶٪) دارای ژن SHV، ۱۹



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن‌های بتالاکتامازی در جدایه های سودوموناس آنروژینوزا

ستون ۱ لدر ۱۰۰bp، ستون ۲ ژن PER، ستون ۳ ژن CTX-M و ستون ۴ ژن SHV



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن‌های بتالاکتامازی در جدایه های سودوموناس آنروژینوزا

ستون ۱ لدر ۱۰۰bp، ستون ۲ ژن CTX-M، ستون ۳ ژن TEM و ستون ۴ ژن GES

از طرف دیگر، بررسی حضور همزمان ژن‌های مورد مطالعه در جدایه‌ها نشان داد که بیشترین حضور همزمان مربوط به ژن‌های CTX-M و PER (۵۵٪) و کمترین نیز به طور مساوی (۹٪) مربوط به SHV - CTX-M، SHV و TEM است. همچنین در بین جدایه‌های واجد ژن‌های بتالاکتامازی ۵۲٪ واجد حداقل یک ژن، ۳۰/۴۳٪ واجد دو ژن و ۱۷/۳۹٪ واجد سه ژن به طور همزمان بودند. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که بین مقاومت جدایه‌ها به پنی‌سیلین‌ها و مونوباکتام‌ها و ژن‌های بتالاکتامازی ارتباط معناداری وجود دارد ($P < 0.05$).

بحث

از زمان کشف آنتی‌بیوتیک‌ها و به کارگیری آن‌ها در درمان بیماری‌ها، باکتری‌ها همواره در تلاش بوده‌اند که بر اساس قانون انتخاب طبیعی بتوانند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت یابند. متأسفانه استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های گذشته علاوه بر تحمیل هزینه‌های درمانی اضافی و تأخیر در ترخیص بیماران از بیمارستان‌ها، سبب پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و شکست درمان شده است. امروزه اطلاعات وسیعی درباره اپیدمیولوژی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های مؤثر در آن از سراسر دنیا وجود ندارد که سبب تجویز نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها توسط برخی پزشکان و افزایش میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو در محیط‌های بیمارستانی می‌گردد (۱۶). در مطالعه حاضر، میزان مقاومت جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریوکسیم ۹۷٪، سفوتاکسیم ۹۵٪، سفتریاکسون ۸۰٪، آزترونام ۷۰٪، جنتامایسین ۶۹٪، سفتازیدیم ۶۷٪، مروپنم ۶۰٪، سیپروفلوکساسین ۶۰٪، پیراسیلین-تازوباکتام ۵۹٪، ایمپنم ۵۷٪، توبرامایسین ۴۸/۵٪، تیکارسیلین-کلاولانیک اسید ۴۸٪، پیراسیلین ۴۵٪، تیکارسیلین ۴۳٪، آمیکاسین ۴۲٪، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید ۳۸٪ و سفپیم ۳۸٪ مشاهده شد که در این میان بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر سفتریوکسیم ۹۷٪ و

کمترین میزان مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفپیم ۳۸٪ و آمیکاسین ۴۲٪ بود. میمنی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ مطالعه مشابهی بر روی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بیمارستانی شهر قم انجام دادند و میزان مقاومت جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریوکسیم ۹۳٪، سفوتاکسیم ۹۳٪، سفتریاکسون ۷۸٪، آزترونام ۶۶٪، جنتامایسین ۶۳٪، سفتازیدیم ۵۹٪، مروپنم ۵۲٪، سیپروفلوکساسین ۵۹٪، پیراسیلین-تازوباکتام ۵۱٪، ایمپنم ۵۲٪، پیراسیلین ۴۱٪ و آمیکاسین ۳۷٪ گزارش کردند. مقایسه نتایج میمنی و همکارانش با مطالعه مذکور نشان می‌دهد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های بیمارستانی *سودوموناس آئروژینوزا* در این منطقه طی سال‌های اخیر افزایش یافته است (۴). در مطالعه حیدری و همکارانش در سال ۱۴۰۱ در جنوب غرب ایران، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب سیپروفلوکساسین ۶۵/۷٪، سفتازیدیم ۵۹/۸٪، پیراسیلین ۵۹/۸٪، آمیکاسین ۷۰/۶٪، آزترونام ۵۴/۹٪، مروپنم ۵۲/۱٪، توبرامایسین ۵۲٪، جنتامایسین ۵۱٪، پیراسیلین-تازوباکتام ۴۲/۲٪ و سفپیم ۳۷/۹٪ گزارش گردید (۱۷). میزان مقاومت جدایه‌ها در مطالعه حاضر همانند مطالعه حیدری بالا بود اما الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در برابر سفپیم، توبرامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین در دو مطالعه مذکور مشابه است. یافته‌های تحقیقات مذکور موید این مطلب است که آنتی‌بیوتیک سفپیم (با میزان مقاومت ۳۸٪) نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* در این مناطق مؤثرتر است. غزاله الهی و همکارانش با بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان‌های استان مازندران در سال ۱۴۰۱ دریافتند که اگرچه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های این منطقه با سایر مناطق کشور متفاوت است اما به دلیل حساسیت بالای جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک سفپیم (با مقاومت ۱۵/۶۲٪) این آنتی‌بیوتیک

آزمودن تعیین حساسیت میکروبی از تأثیر آن اطمینان حاصل کرده و از مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری به عمل آید تا شاهد حرکت فزاینده مقاومت نسبت به آن‌ها در آینده نباشیم. بتالاکتام‌ها از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که در درمان انواع عفونت‌ها به کار می‌روند. تولید بتالاکتام‌ها مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است که بسیاری از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با تولید انواع مختلفی از بتالاکتام‌ها و وسیع الطیف قادر به ایجاد مقاومت در برابر بسیاری از سفالوسپورین‌ها، پنی‌سیلین‌ها و مونوباکتام‌ها می‌باشند (۲۲). ژن‌های کد کننده بتالاکتام‌ها و وسیع الطیف بر روی کروموزوم، پلاسمید و سایر عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند که سبب گسترش آن‌ها در بین باکتری‌ها می‌گردد (۸). بنابراین شناسایی باکتری‌های مولد بتالاکتام‌ها و وسیع الطیف جهت محدود کردن انتشار آن‌ها در راستای پیشگیری از افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در آینده، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. نتایج بررسی‌های مولکولی شیوع ژن‌های بتالاکتام‌ها در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در مطالعه حاضر نشان داد که ۵ جدایه (۴/۹۵٪) دارای ژن TEM، ۴ جدایه (۳/۹۶٪) دارای ژن SHV، ۱۹ جدایه (۱۸/۸۱٪) دارای ژن CTX-M، ۶ جدایه دارای ژن PER (۵/۹۴٪) و ۱ جدایه (۰/۹۹٪) دارای ژن GES بود. طوری که بیشترین فراوانی را ژن CTX-M و کمترین فراوانی را ژن GES داشت. در بررسی مطالعات مشابه در قسمت‌های مختلف ایران و سایر نقاط جهان، نتایج مشابه و متفاوتی مشاهده شد. در مطالعه عرفانه قباخلو و همکارانش در سال ۱۴۰۳ در تهران بر روی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مشخص شد که ۵/۵٪ جدایه‌ها واجد ژن SHV، ۵/۵٪ جدایه‌ها واجد ژن CTX-M بودند و در هیچ‌یک از جدایه‌ها ژن TEM مشاهده نشد (۱۹). هرچند فراوانی تمامی ژن‌های مورد بررسی در مطالعه ایشان با پژوهش حاضر مطابقت ندارد اما در مورد ژن SHV تشابه در یافته‌ها مشاهده می‌شود و شیوع ژن‌های TEM و CTX-M پایین‌تر از مطالعه مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره سی و آذر و دی ۱۴۰۴

در این منطقه نیز نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها اثربخشی بهتری در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا دارد (۱۸). طی مطالعه عرفانه قباخلو و همکارانش در سال ۱۴۰۳ در تهران بر روی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مشخص شد که جدایه‌ها در برابر کولیستین (با میزان مقاومت ۱/۸٪) از حساسیت بالایی برخوردار بودند اما به دلیل عواملی مانند هزینه قابل توجه کولیستین و سمیت کلیوی آن، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (با میزان مقاومت ۳۰٪) و آمیکاسین (با میزان مقاومت ۲۷٪) را به‌عنوان آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا گزارش نمودند (۱۹).

در مطالعه Hosu و همکارانش در جنوب آفریقا در سال ۲۰۲۱ مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۰۴ جدایه سودوموناس آئروژینوزا به‌صورت آزترونام ۵۷/۸٪، جنتامایسین ۳۵/۳٪، سفتازیدیم ۵۱٪، سیپروفلوکساسین ۸۸/۷٪، پیراسیلین-تازوباکتام ۵۰/۵٪، ایمپنم ۶۶٪، پیراسیلین ۶۴/۲٪، آمیکاسین ۲۰/۱٪ و سفپیم ۵۱/۵٪ گزارش گردید (۲۰). در مطالعه Rodulfo و همکارانش در آمریکای لاتین (۲۱) میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفپیم و ایمپنم به ترتیب ۶۷٪ و ۷۶٪ گزارش گردید. بررسی مطالب فوق نشان می‌دهد که مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل چهارم و کاربامپنم‌ها در ایران پایین‌تر از این کشورها است. نتایج مطالعات مذکور مدارکی دال بر گسترش بالای سویه‌هایی از سودوموناس آئروژینوزا در مناطق مختلف را ارائه می‌کند که اغلب نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاوم شده‌اند که به نظر می‌رسد به دلیل مصرف بالای این داروها در حوزه درمان است، این در حالی است که در بسیاری از مناطق مقاومت پایینی در برابر سفالوسپورین‌های نسل چهارم در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مشاهده می‌گردد که این داروها امروزه به‌عنوان گزینه‌های دارویی اندک برای مبارزه با این باکتری در بسیاری از موارد عفونت باقی‌مانده‌اند، بنابراین باید قبل از تجویز دارو با انجام

عفونت، شستشوی دست با مواد ضدعفونی‌کننده نظیر کلرهگزیدین و مواد الکلی دار، پرهیز از تجویزهای نادرست آنتی‌بیوتیکی در مرحله درمان و خودداری از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک و اقداماتی از این نوع تا حد زیادی می‌توانند در کنترل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثر است.

نتیجه‌گیری

در اطلاعات به‌دست‌آمده طی سال‌های اخیر، مشاهده‌شده است که با توجه به مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا، حتماً باید قیل از تجویز دارو و آغاز درمان عفونت‌های حاصله از این باکتری با انجام آزمون تعیین حساسیت میکروبی، آنتی‌بیوتیک مناسب انتخاب گردد تا احتمال به وجود آمدن سویه‌های مقاوم در آینده کاهش یابد. همچنین به نظر می‌رسد ژن CTX-M در مقایسه با سایر ژن‌های بتالاکتامازی موردبررسی، نقش بیشتری در مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا دارد، زیرا انتشار این ژن در جدایه‌های مقاوم بیشتر از سایر ژن‌ها بوده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارکنان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم تشکر و قدردانی می‌گردد. تحقیق حاضر پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم سمانه ملکشاهی بوده و هیچ‌گونه حمایت مالی دریافت نکرده است و با کد اخلاق IR.IAU.QOM.REC.1402.188 مورد تأیید کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم قرار گرفته است. تمام نویسندگان در مراحل تحقیق و نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند و تضاد منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

حاضر است. شیوع ژن CTX-M در مطالعه حاضر دقیقاً مانند شیوع این ژن در مطالعه رحیمی و همکارانش در سال ۱۴۰۰ است اما در بررسی آن‌ها شیوع ژن‌های TEM و SHV نسبت به مطالعه حاضر بالاتر است (۲۳). غزاله الهی و همکارانش در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان‌های استان مازندران در سال ۱۴۰۱ شیوع ژن CTX-M را نزدیک به مطالعه حاضر (۱۲٪) گزارش کردند اما شیوع ژن‌های TEM (۱۹٪) و SHV (۲۶٪) نسبت به مطالعه حاضر بالاتر گزارش شد (۱۸). در مطالعه فرزانه فرضعلی شیره جینی و همکارانش شیوع ژن CTX-M هم‌راستا با مطالعه حاضر بود (۲۴) اما فراوانی ژن TEM (۳۴٪) بسیار بالاتر از نتایج پژوهش حاضر در رابطه با این ژن بود. میرصالحیان و همکارانش در سودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه‌های سوختگی، درصد شیوع ژن‌های PER و VEB را به ترتیب ۲۵/۵٪ و ۳۱/۴٪ گزارش شد که این میزان بسیار بیشتر از مطالعه حاضر است (۷). در نهایت مطالعه حاضر بیانگر این است که با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا و شیوع نسبتاً پائین ژن‌های موردبررسی در آن‌ها، این جدایه‌ها از مکانیسم‌های متنوعی برای ایجاد مقاومت استفاده می‌کنند و تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی تنها عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آن‌ها نیست. همچنین، اقدامات پیشگیرانه متعددی را می‌توان برای کنترل شیوع ارگانیزم‌های مقاوم در محیط‌های مختلف برشمرد که اطلاع‌رسانی به افراد جامعه، رعایت بهداشت فردی-اجتماعی، ارائه آموزش‌های لازم به کارکنان بیمارستان‌ها و مراکز درمانی در زمینه ممانعت از انتقال ارگانیزم‌های مقاوم و راه‌های کنترل آن‌ها، تجهیز آزمایشگاه‌های تشخیصی به‌منظور شناسایی هرچه دقیق‌تر ارگانیزم‌های مقاوم، ایزولاسیون بیماران مبتلابه عفونت‌های ناشی از ارگانیزم‌های مذکور، استفاده از دستکش و لباس‌های مخصوص به‌منظور جلوگیری از تماس با منابع

1. Hossseini Bafghi M, Ghanipour F, Nazari R, Aghaei SS, Jafari P. Enhancing the antibacterial impact of lipopeptide extracted from *Bacillus licheniformis* as a probiotic against MDR *Acinetobacter baumannii*. *Front Biosci.* 2024;29(5):171-85.[<https://doi.org/10.31083/j.fb12905171>]
2. Asadijoubari M, Goli HR. Frequency of MDR and XDR Strains and Antibiotic Resistance Pattern of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Sari Hospitals, Iran. *J Mazand Univ Med Sci.* 2020;30(188):89-99.[Full Text in Persian]
3. Meimani F, Nazari R, Rostami MN. Detection of metallo-beta-lactamase-encoding genes among clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* in Qom Province. *Zahedan J Res Med Sci.* 2018;20(9):595-609.[<https://doi.org/10.5812/zjrms.59559>]
4. Magiorakos AP, Srinivassan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268-81.[doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x]
5. Goel V, Hogade SA, Karadesai S. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases, AmpC beta-lactamase, and metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in a tertiary care hospital. *J Sci Soc* 2013;40(1):28-35.[doi:10.4103/0974-5009.109691]
6. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns.* 2006;32(3):343-47.[doi:10.1016/j.burns.2005.10.017]
7. Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns.* 2010;36:70-74.[doi: 10.1016/j.burns.2009.01.015]
8. Lee S, Park Y, Kim M, Lee H, Han K, Kang C, et al. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):122-27.[doi:10.1093/jac/dki160]
9. Akhavan Tafti F, Zandi H, Vakli M, Mousavi M, Zarei M. Frequency of beta-lactamase and metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn wounds in Yazd burn hospital during. *Kashan Univ Med Sci.* 2014; 18(2):167-74.[Full Text in Persian]
10. Shahcheraghi F, Nikbin V, Feizabadi M. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran. *Microb Drug Resist.* 2009;15(1):37-49.[doi:10.1089/mdr.2009.0880]
11. Imani Foolad AA1, Ph.D; Rostami Z2, MSc; Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods. *J Ardebil Med School.* 2010;10:3:189-98.[Full Text in Persian]
12. Ghanipour F, Nazari R, Aghaei ss, Jafari P. Effect of lipopeptide extracted from *Bacillus licheniformis* on the expression of *bap* and *luxI* genes in multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Amino Acids.* 2023;55:1891-907.[<https://doi.org/10.1007/s00726-023-03346-6>].
13. Abbey TC, Deak E. What's new from the CLSI subcommittee on antimicrobial susceptibility testing M 100. *Clin Microbiol Newsl.* 2019;41(23):203-9.
14. Al-Shamiri MM, Zhang S, Mi P, Liu Y, Xun M, Yang E, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Acinetobacter baumannii* enrolled in the relationship among antibiotic

- resistance, biofilm formation and motility. *Microb Pathog.* 2021;155:104-22.[<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104922>]
- 15.Karami F, Nazari R, Adeli H. Detection of Genes Encoding Metallo-beta-lactamases in Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Kerman Univ Med Sci.* 2021;28:559–67.[<https://doi.org/10.22062/JKMU.2021.91827>]
- 16.Eshtiaghi S, Nazari R, Fasihi-Ramandi M. Molecular Docking, Anti-Biofilm & Antibacterial Activities and Therapeutic Index of mCM11 Peptide on *Acinetobacter baumannii* Strains. *Curr Microbiol.* 2023;80:191-206.[<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03217-z>]
- 17.Heidari R, Farajzadeh Sheikh A, Hashemzadeh M, Farshadzadeh Z, Salmanzadeh S, Saki M. Antibiotic resistance, biofilm production ability and genetic diversity of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from nosocomial infections in southwestern Iran. *Mol Biol Rep.* 2022; 49(5): 3811-22.[doi: 10.1007/s11033-022-07225-3]
- 18.Elahi G, Goli HR, Salehian M, Gholami M. Prevalence of MDR, XDR and PDR phenotypes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Mazandaran province, Iran. *J Mazand Univ Med Sci.* 2021; 31(203):61-72.[Full Text in Persian].
- 19.Ghobakhloo E, Noorbakhsh F, Baghani F. Evaluation of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC betalactamase activity in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *J Microb Biol.* 2024;13(51):35-50.[doi:10.22108/bjm.2024.141472.1593]
- 20.Hosu MC VS, Okuthe GE, Apalata T. Detection of extended spectrum beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in rural Eastern Cape Province, South Africa. *Sci rep.* 2021;11(1):1-8.[<https://doi.org/10.1038/s41598-021-86570-y>]
- 21.Rodulfo H, Arcia A, Hernández A, Michelli E, Martinez DdV, Guzman M, et al. Virulence factors and integrons are associated with MDR and XDR phenotypes in nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a Venezuelan university hospital. *Rev Inst Med Trop S. Paulo.* 2019;61-72. [<https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961020>]
- 22.Empel J, Filczak K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Warsaw, Poland: Further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2829-34.[doi:10.1128/JCM.00997-07]
- 23.Rahimi E, Asgari A, Azimi T, Meigono SS. Molecular detection of carbapenemases and extended-spectrum beta-lactamases encoding genes in clinical isolates in *Pseudomonas aeruginosa* in Iran. *Jundishapur J Microbiol.*2021;14(7):1-6.[doi:10.5812/jjm.115977]
- 24.Shirehjini FF, Amini K, Fatahi H. Identification of bla CTX-M, bla SHV and bla TEM genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from human and animal samples using multiplex PCR methods. *Qom Univ Med Sci.* 2017;10(11):51-60. [Full Text in Persian].