

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره هشتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۸، ۳۰۲-۲۹۵

بررسی وضعیت عفونت نهفته هپاتیت B در بیماران تالاسمی آلوده به هپاتیت C استان کرمان در سال ۱۳۸۶

محمد کاظمی عرب آبادی^۱، غلامحسین حسن شاهی^۲، محسن رضائیان^۳، ابراهیم رضازاده زرنندی^۴،

رضا وزیری نژاد^۵

دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۱۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۷/۱۲/۱۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۸/۱۹ پذیرش مقاله: ۸۸/۹/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: بیماران مبتلا به تالاسمی به علت دریافت خون به طور مستمر در معرض ابتلا به بیماری‌های عفونی منتقله از طریق خون مثل هپاتیت B و C می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع عفونت نهفته هپاتیت B و شاخص‌های آن در بیماران مبتلا به تالاسمی آلوده به ویروس هپاتیت C بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، در طی ماه‌های فروردین تا شهریور ۱۳۸۷ از دو مرکز شهرستان‌های کرمان و رفسنجان تعداد ۶۰ نفر بیمار مبتلا به تالاسمی از نظر آلودگی به ویروس هپاتیت C با روش Reverse Transcription-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. سپس موارد آلوده به ویروس هپاتیت C، از نظر آلودگی به ویروس هپاتیت B با روش PCR و میزان HbsAg، anti-HBc و anti-HBs بیماران با روش الیزا بررسی شد.

یافته‌ها: مطالعه حاضر نشان داد که ۲۷ نفر از افراد مورد مطالعه (۴۵٪)، آلوده به HCV بودند، اما هیچ‌گونه آلودگی به HBV در افراد آلوده به HCV مشاهده نشد. نتایج این مطالعه هم‌چنین نشان داد که ۹ نفر (۳۳٪) از افراد آلوده به HCV از نظر anti-HBc و ۱۱ نفر (۴۰٪) از نظر anti-HBs مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع عفونت نهفته هپاتیت B (Occult Hepatitis B Infection) در بیماران مورد مطالعه (بر خلاف آلودگی به HCV) بسیار پایین است. این حالت می‌تواند احتمالاً به علت اثر مهارتی HCV بر سیستم ترجمه سلول میزبان و متعاقباً HBV باشد.

واژه‌های کلیدی: هپاتیت B، هپاتیت C، HBV، عفونت نهفته هپاتیت B، تالاسمی

۱- (نویسنده مسئول) مربی، گروه آموزشی ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۰۳، دورنگار: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: kazemi24@yahoo.com

۲- استادیار گروه آموزشی خون‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۳- دانشیار گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۴- مربی گروه آموزشی میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۵- دانشیار گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

مقدمه

عفونت‌های هپاتیت B و هپاتیت C از علل اصلی بیماری‌های کبدی در بیماران تالاسمی می‌باشند [۱-۲]. عفونت نهفته هپاتیت B (OBI) شکل شناخته شده جدیدی از عفونت هپاتیت B است که با عدم وجود HBsAg و وجود HBV-DNA مشخص می‌شود [۳-۴]. این شکل از عفونت می‌تواند با عوارض و آسیب‌های متعددی از جمله سیروز و سرطان کبد همراه باشد [۳-۶]. از جمله سازوکارهای ایجادکننده OBI، همراه شدن این عفونت با عفونت هپاتیت C است [۵] در یک مطالعه گزارش شده است که پروتئین مرکزی ویروس هپاتیت C (HCV) باعث تنظیم کاهشی بیان پروتئین‌های میزبان و دیگر ویروس‌های آلوده‌کننده سلول میزبان از جمله ویروس هپاتیت B (HBV) می‌شود [۵]. به استناد همین مطالعه، زمانی که این دو عفونت به طور هم زمان ایجاد می‌شوند ممکن است که پروتئین HBsAg توسط HBV بیان نشود [۵]. بیماران مبتلا به تالاسمی به علت دریافت مستمر خون، در معرض ابتلا به بیماری‌های عفونی منتقله از طریق خون مثل هپاتیت B و هپاتیت C می‌باشند [۷]. اگر چه میزان شیوع عفونت نهفته هپاتیت B و عفونت هم‌زمان این دو بیماری در این دسته بیماران مشخص نیست اما وجود عفونت نهفته هپاتیت B در بیماران آلوده به هپاتیت C، سرطان سلول‌های کبدی، بیماران دیالیزی، بیماران آلوده به HIV، بیماران دریافت‌کننده دائمی خون (مانند بیماران هموفیلی و ...) و اهدا کنندگان خون در دو گزارش منتشر شده است [۳، ۵]. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع عفونت نهفته هپاتیت B در بیماران مبتلا به تالاسمی آلوده به HCV و هم‌چنین بررسی شاخص‌های مربوط به HBV در این دسته بیماران بود.

مواد و روش‌ها

روش انتخاب نمونه‌ها و جمع‌آوری داده‌ها: این مطالعه مقطعی در طی ماه‌های فروردین تا شهریور ۱۳۸۷ طراحی گردید. جمعیت مورد مطالعه تمامی بیماران تالاسمی مراجعه‌کننده به دو مرکز بیمارستان علی‌ابن‌ابیطالب (ع) رفسنجان (۲۵ نفر) و بنیاد خیریه ثامن‌الحجج کرمان (۳۵ نفر) بودند. در مجموع از ۶۰ نفر بیمار مبتلا به تالاسمی مراجعه‌کننده به دو مرکز، نمونه خون با رضایت کتبی و طی مراجعات معمول ایشان به مراکز فوق گرفته شد. اطلاعات مربوط به سن، جنس و مدت زمان دریافت خون توسط پرسش‌نامه جمع‌آوری شد. لازم به ذکر است که تمامی بیماران بر علیه هپاتیت B واکسینه شده بودند. ابتدا بیماران تالاسمی از نظر HCV مورد بررسی قرار گرفتند و در ادامه بیماران آلوده به HCV از نظر شاخص‌های HBV (anti-HBc، HBV-DNA، anti-HBs و anti-HBc) ارزیابی شدند. تمامی نمونه‌های HCV مثبت که آلودگی آنها در طی مطالعه قبل با روش RT-PCR به اثبات رسیده بود [۸] وارد این مطالعه شدند.

تست‌های الیزا: برای بررسی نمونه‌ها از نظر HBsAg، anti-HBc و anti-HBs از کیت‌های الیزای تجارتي (RADIM, Italy) استفاده شد. اساس کیت اندازه‌گیری HBsAg، ساندویچ و کیت‌های anti-HBc و anti-HBs رقابتی بود.

استخراج DNA و بررسی: برای استخراج HBV-DNA ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما با ۱۰۰ میکرولیتر پروتئیناز k مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس استخراج توسط روش فنل/کلروفرم انجام شد. بعد از ته نشین کردن DNA توسط اتانول، مقدار ۳۰

مثبت بودن نمونه است. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از نشانگر ۱۰۰ جفت بازی از شرکت سیناژن استفاده شد.

آزمون آماری: اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱۱ مورد پردازش قرار گرفت. از آزمون آماری استفاده گردید و سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمایشات HCV-RNA RT-PCR (طی مدت ۶ ماه) نشان داد که ۲۷ نفر از ۶۰ بیمار مورد مطالعه (۴۵٪) آلوده به هیپاتیت C بودند. ۱۶ نفر (۵۹/۲٪) از افراد آلوده به هیپاتیت C مرد و ۱۱ نفر (۴۰/۸٪) زن بودند. میانگین سنی بیماران آلوده و غیر آلوده در جدول ۱ آورده شده است. همان گونه که جدول نشان می دهد تفاوت دو گروه از نظر سن دارای اختلاف معنی دار آماری می باشد ($p < 0.05$).

جدول ۱- مقایسه بیماران تالاسمیک آلوده و غیر آلوده به ویروس هیپاتیت C از نظر سن

HCV	تعداد	میانگین سن	انحراف معیار	حداقل	حداکثر	نتایج آزمون
منفی	۳۳	۱۰/۱۳	۵/۱۸	۱	۲۳	
مثبت	۲۷	۱۴/۵۰	۶/۰۷	۲	۲۵	* $p < 0.05$
جمع	۶۰	۱۲/۱۰	۵/۹۷	۱	۲۵	

*: تفاوت معنی دار آماری (T-test, case VS control), $p < 0.05$.

اطلاعات به دست آمده حاصل از پرسشنامه‌ها مبنی بر مدت دریافت خون بر حسب ماه، بر وجود اختلاف معنی دار آماری در این بیماران دلالت می کند ($p < 0.05$) (جدول ۲).

میکرولیتزر آب فاقد آنزیم DNase به آن اضافه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۵).

PCR: PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر همانند RT-PCR به انجام رسید با این تفاوت که از DNA استخراج شده به جای cDNA استفاده شد. ترتیب توالی پرایمر جلو برنده 5'-TAT GTT TCC CTC CTG CTG CT-3' و ترتیب توالی پرایمر معکوس 5'-CCC CCA ACT CCC AAT TCT AT-3' بود. طی این آزمایش، مقدار ۵۰۰ جفت باز از ژنوم HBV تکثیر شد. سیکل های PCR به این گونه بود: یک سیکل ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه. یک نمونه کنترل مثبت از ژنوم HBV از شرکت سیناژن تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز مانند مرحله قبل انجام شد. وجود باند ۵۰۰ جفت بازی نشانگر

نتایج نشان داد که ۵۰٪ از مردان و ۴۱٪ از زنان آلوده به HCV بودند. با انجام آزمون آماری t بین دو گروه اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد.

جدول ۲- مقایسه بیماران تالاسمیک آلوده و غیر آلوده به ویروس هیپاتیت C از نظر مدت زمان دریافت خون.

HCV	تعداد	میانگین مدت دریافت خون بر حسب ماه	انحراف معیار	حداقل	حداکثر	نتایج آزمون
منفی	۳۳	۱۱۰/۳۱	۶۱/۴	۶	۲۶۴	
مثبت	۲۷	۱۶۱/۲۵	۷۰	۱۲	۲۷۶	*P<۰/۰۵
کل	۶۰	۱۳۳/۲۷	۶۹/۳۱۲	۶	۲۷۶	

*: تفاوت معنی دار آماری (T-test, case VS control), $p < 0.05$

با بررسی سرم بیماران از نظر وجود HBsAg مشخص شد که تمام نمونه‌ها از نظر این شاخص منفی هستند اما ۹ نفر (۳۳٪) از ۲۷ بیمار آلوده به HCV دارای anti-HBc و ۱۱ نفر (۴۰/۷٪) نفر دارای anti-HBs بودند. مطالعات حاصل از HBV-DNA PCR نیز نشان داد که تمامی بیماران تالاسمی آلوده به هیپاتیت C، از نظر HBV-DNA منفی بودند.

بحث

شیوع بالای ۴۵ درصدی آلودگی به HCV در بیماران مبتلا به تالاسمی با مطالعات دیگر محققین هم‌خوانی دارد. نتایج تحقیق حاضر همانند دیگر گزارش‌ها از سراسر ایران، شیوع بالایی از آلودگی به HCV را نشان می‌دهد [۸، ۲]. به گونه‌ای که محققین شیوع این عفونت را در مبتلایان به تالاسمی، از ۲۳/۸٪ تا ۶۲٪ گزارش نموده‌اند [۹، ۲]. از سویی دیگر نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که شیوع OBI در بیماران تالاسمی آلوده به HCV استان کرمان بسیار پایین می‌باشد. مطالعات بر روی بیماران دیالیزی نیز نتایج مشابهی در بر داشت [۵]. جستجو در مجلات برای پیدا کردن مقالاتی مبنی بر بررسی شیوع OBI در بیماران تالاسمی آلوده به HCV نتیجه‌ای در بر نداشت و می‌توان گفت شاید مطالعه حاضر اولین

مطالعه‌ای می‌باشد که به بررسی شیوع عفونت نهفته هیپاتیت B در بین بیماران تالاسمی آلوده به HCV پرداخته است. نتایج مطالعه Arababadi و همکاران بر روی بیماران دیالیزی آلوده به HCV با نتایج این مطالعه کاملاً مشابهت داشت [۵]. از آنجایی که هر دو دسته این بیماران به طور دایم خون و فرآورده‌های آن را دریافت می‌کنند، شاید بتوان این‌گونه نتیجه گرفت که خون‌های آلوده دلیل اصلی آلودگی به HCV و بالعکس، پاک بودن خون‌های تزریقی مانع از آلودگی به HBV شده است. اما مطالعات مختلفی بر روی میزان anti-HBc در این دسته بیماران انجام شده است. مطالعات در ژاپن نشان می‌دهند که ۸۱٪ بیماران مبتلا به هیپاتیت C در ژاپن [۱۰] و ۲۱٪ از این دسته از بیماران در برزیل [۱۱] دارای anti-HBc بودند. با توجه به نتایج مطالعات قبلی محققین حاضر شاید بتوان اینگونه نتیجه گیری کرد که شیوع anti-HBc در بیماران مبتلا به هیپاتیت C بالاتر از دیگر افراد است. زیرا مطالعات قبلی بر روی اهداء کنندگان خون، میزان شیوع را ۵/۱۸٪ [۳] و ۸٪ [۴] نشان داد. شیوع بالاتر anti-HBc در این دسته از بیماران توسط دیگر محققین نیز به اثبات رسیده است. نتایج مطالعه‌ای در چین با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد [۱۲]. اما در مورد شیوع OBI در اهداکنندگان خون نتیجه کاملاً بر عکس است زیرا

به HBV نسبت به میزان HCV-RNA در افراد آلوده به HCV به مراتب پایین‌تر می‌باشد [۲] و شاید این خود دلیلی دیگر بر بالاتر بودن شیوع آلودگی به HCV در این دسته افراد باشد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که نمونه‌های خون بایستی با دقت بیشتری از نظر آلودگی به HCV و با آزمایش‌های به مراتب حساستری مثل RT-PCR از طرف سازمان انتقال خون مورد بررسی قرار بگیرند تا خون و فرآورده‌های سالم‌تری در اختیار بیماران قرار گیرد. از طرفی با توجه به این که اکثر بیماران علی‌رغم واکسیناسیون علیه هپاتیت B، دارای سطح خوبی از آنتی‌بادی بر علیه HBsAg نبودند، می‌توان به این نکته دست یافت که این دسته بیماران نسبت به این واکسن بی‌پاسخ (non-responder) می‌باشند و بالطبع بررسی این دسته از بیماران پس از واکسیناسیون از نظر میزان آنتی‌بادی تولیدی می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین‌وسیله از کارکنان محترم بنیاد خیریه ثامن‌الحجج کرمان و کارکنان محترم مرکز دیالیز بیمارستان علی‌ابیطالب (ع) رفسنجان که در انجام این طرح همکاری کردند و همچنین تمامی بیمارانی که بدون هیچ چشم‌داشتی اقدام به اهدای خون نمودند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

مطالعات نشان می‌دهند که شیوع بالایی از این شکل عفونت در اهداکنندگان خون وجود دارد [۴-۳]. حال این سوال پیش می‌آید که با توجه به شیوع بالای OBI در اهداکنندگان خون، چرا این شکل از عفونت در بیماران تالاسمی آلوده به HCV بسیار پایین می‌باشد؟ در جواب می‌توان چندین علت را ذکر کرد: ۱. وجود عفونت HCV به طور هم‌زمان، منجر به کاهش شدید بیان پروتئین‌های HBV و خاموشی کامل این ویروس در داخل بدن می‌شود. ۲. در طی OBI میزان HBV-DNA در سرم بیماران بسیار متغیر می‌باشد به طوری که در بعضی مواقع تست PCR مثبت و بعضی مواقع منفی می‌شود [۳]. از طرفی با توجه به این که تمامی بیماران با واکسن HBsAg بر علیه هپاتیت B واکسینه شده بودند می‌توان دلیل دیگر منفی شدن آزمایش HBV-DNA PCR در این افراد را واکسینه بودن بیماران دانست.

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که اکثر بیماران آلوده به HCV دارای رقت قابل قبولی از anti-HBs نبودند. این امر نشان می‌دهد که سیستم ایمنی این افراد قادر به پاسخ‌گویی مناسب به واکسن هپاتیت B نبوده است و شاید همین نقص در سیستم ایمنی هم‌وزن این افراد باعث شده که به هپاتیت C نیز آلوده شوند. اما در جواب این سوال که با وجود تیترا پایین anti-HBs چرا این افراد آلوده به HBV نشده‌اند نیز می‌توان به توضیحات بالا اشاره کرد و همچنین می‌توان ذکر نمود که به طور کلی میزان HBV-DNA موجود در خون محیطی در افراد آلوده

References

- [1] Chakrabarti S, Pradhan P, Roy A, Hira M, Bandyopadhyay G, Bhattacharya DK. Prevalence of anti HCV, HBsAg and HIV antibodies in high risk recipients of blood and blood products. *Indian J Public Health* 2006; 50(1): 43-4.
- [2] Mirmomen S, Alavian SM, Hajarizadeh B, Kafaee J, Yektaparast B, Zahedi MJ, et al. Epidemiology of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus infections in patients with beta-thalassemia in Iran: a multicenter study. *Arch Iran Med* 2006; 9(4): 319-23.
- [3] Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Mohit M, Hajghani M, et al. Evaluation of expression rate of chemokines receptor CCR5 on peripheral blood CD8+ T cells of occult hepatitis B infected patients. *J Mazand Univ Med Sci* 2009; 18 (68): 11-8. [Farsi]
- [4] Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Arababadi MK, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection of HBV DNA in HBsAg Negative Normal Blood Donors. *IJI* 2005; 2 (3): 172-6.
- [5] Arababadi MK, Hassanshahi G, Yousefi H. HBV-DNA in hemodialysis patients infected by HCV. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009; 20(3): 398-401.
- [6] Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002; 9(4): 243-57.
- [7] Chakravarti A, Verma V, Kumaria R, Dubey AP. Anti-HCV seropositivity among multiple transfused patients with beta thalassaemia. *J Indian Med Assoc* 2005; 103(2): 64-6.
- [8] Hassanshahi G, Arababadi MK, Zarandi ER, Moradi M, Vazirinegad R, Daredor YH, et al. Prevalence of HCV infection in thalassaemic and hemodialysis patients in Kerman province-Iran. *J Iran spec Epidem* 2009; 5 (1): 1-6.
- [9] Ansar MM, Kooloobandi A. Prevalence of hepatitis C virus infection in thalassaemia and haemodialysis patients in north Iran-Rasht. *J Viral Hepat* 2002; 9(5): 390-2.
- [10] Matsuzaki Y, Chiba T, Hadama T, Asaoka H, Doy M, Shoda J, et al. HBV genome integration and genetic instability in HBsAg-

- negative and anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer J Lett* 1997; 119(1): 53-61.
- [11] Branco F, Mattos AA, Coral GP, Vanderborght B, Santos DE, Franca P, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Brazil. *Arq Gastroenterol* 2007; 44(1): 58-63.
- [12] Liu Z, Hou J. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) dual infection. *Int J Med Sci* 2006; 3(2): 57-62.

Evaluation of Occult Hepatitis B Virus Infection in Thalassemic Patients Infected by HCV in Kerman Province of Iran

M. Kazemi Arababadi¹, Gh. Hassanshahi², M. Rezaeian³, E. Rezazadeh Zarandi⁴, R. Vazirinejad⁵

Received: 03/01/09

Sent for Revision: 08/03/09

Received Revised Manuscript: 31/10/09

Accepted: 20/12/09

Background and Objectives: Thalassemic patients are at risk of blood transmitted infectious diseases such as hepatitis B and C, due to continued receiving of blood and its components. The aim of this study was to investigate the prevalence of occult Hepatitis B Virus infection (OBI) and HBV markers in thalassemic patients with Hepatitis C infection.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 60 thalassemic patients were examined for HCV infection by Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) during Apr-Sep 2007 in the Kerman province of Iran. Hepatitis B virus infection was evaluated in the HCV positive thalassemic patients by PCR. Anti-HBc, anti-HBs and HBsAg were detected using ELISA.

Results: Results indicated that although 27 (45%) of the cases, out of 60, were infected by HCV, but HBV-DNA was not detected in the HCV infected patients. The findings also showed that 9 (33%) out of 27 HCV-RNA positive patients were anti-HBc positive and 11 (40.7%) out of 27 patients were positive for anti-HBs.

Conclusion: Results of this study indicated that the prevalence of OBI was very low in thalassemic patients (in contrast to HCV infection). However, this value is probably due to the inhibitory effects of HCV on host cell translation system which affects HBV protein translation.

Key words: Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis C Virus, Hepatitis B Virus, Occult Hepatitis B Infection, Thalassemia

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences approved the study.

1- Instructor, Dept. of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

(Corresponding Author) Tel: (0391)5234003, Fax: (0391) 5225209, E-mail: kazemi24@yahoo.com

2- Assistant Prof., Dept. of Hematology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

3- Associate Prof., Dept. of Social Medicine, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

4- Instructor, Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

5- Associate Prof., Dept. of Social Medicine, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran