Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۲، ۱۵۲-۱۴۹

# تعیین آلودگی آب مورد استفاده در سیستم خنک کننده لاشه طیور به باکتریهای جنس سالمونلا و گونه‌های انتریتیدیس و تایفی موریوم در کشتارگاه صنعتی شهرستان مشهد با استفاده از روش Multiplex-PCR

عبدا... جمشیدی[1*] داوود نقدی پور[2]

۱) گروه آموزشی بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ـ ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ـ ایران.

(دریافت مقاله: ۲۴ خرداد ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۱۱ بهمن ماه ۱۳۸۹)

## چکیده

**محصولات طیور به عنوان یکی از مهمترین عوامل انتقال عفونت سالمونلائی در انسان شناخته شده است. آب مورد استفاده در قسمت پرکنی، پیش سردکن و سردکن (چیلر) در پروسه کشتار طیور می تواند موجب انتقال متقابل باکتری‌ها گردد. آب پیش‌سردکن و چیلر در پروسه کشتار طیور در مشهد به ترتیب هر ۲ و ۵ ساعت یکبار تعویض می‌گردد. در این بررسی تعداد ۵۲ نمونه، از آب منبع، آب پیش‌سردکن و چیلر کشتارگاه صنعتی طیور مشهد در ساعت‌های متوالی کاری با چهار تکرار در چهار روز برداشت گردید و با استفاده از روش کشت مرسوم شامل مراحل پیش غنی‌سازی، غنی‌سازی و کشت در محیط‌های اختصاصی و تفریقی، تعداد ۱۰ نمونه آلوده به جنس سالمونلا تشخیص داده شد. تمامی موارد مثبت مربوط به نمونه آب چیلر، و بیشترین میزان آلودگی مربوط به ساعت‌های انتهائی قبل از تعویض آب بود. جهت تایید تشخیص کلنی‌های جداسازی شده به عنوان جنس سالمونلا و تعیین سروارهای تایفی موریوم و انتریتیدیس، کلنی‌های جداسازی شده به روش مولتی پلکس PCR با استفاده از سه جفت پرایمر شامل S141 و S138 اختصاصی ژن *invA*، پرایمرهای Fli15 و Tym اختصاصی ژن *fliC* و پرایمرهای Prot6e-5 و Prot6e-6 اختصاصی ژن *Prot6E* که به ترتیب اختصاصی جنس سالمونلا و سروارهای تایفی موریوم و انتریتیدیس می‌باشند مورد آنالیز قرارگرفت، در این بررسی ۱۹/۲ درصد آلودگی به جنس سالمونلا، ۱/۹ درصد به سالمونلا تایفی موریوم، ۵/۸ درصد به سالمونلا انتریتیدیس و ۱۱/۵ درصد به سایر سروارها مشخص گردید. با توجه به حضور گونه‌های بیماری زا در آب مورد استفاده در خط کشتار، استفاده از جریان متقابل آب و لاشه در چیلر و نیز استفاده از مواد ضدعفونی کننده توصیه می‌گردد.**

**واژه‌های کلیدی:** جنس سالمونلا، سالمونلا تایفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس، مولتی پلکس PCR.

## مقدمه

طیوری که به کشتارگاه ارسال می‌گردند می توانند حامل باکتری‌های پاتوژن و غیر پاتوژن در سطح پوست و پرها و نیز در محتویات روده‌ها باشند. این باکتری‌ها می توانند طی مراحل مختلف فرایند تولید گوشت طیور به سایر لاشه‌ها منتقل شوند (۱). آب مورد استفاده در قسمت پرکنی، پیش سردکن و سردکن (چیلر) در پروسه کشتار طیور می تواند موجب انتقال متقابل باکتری‌ها گردد، لذا آب مورد استفاده در این قسمت‌ها به عنوان یکی از عوامل انتقال باکتری‌ها بین لاشه‌های طیور حائز اهمیت است (۲).

سروارهای مختلف جنس سالمونلا به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن‌های غذائی در جهان محسوب می‌گردند (۳). حیوانات مخزن اصلی این پاتوژن می‌باشند (۴) و طیور منشاء اصلی انتقال آلودگی به انسان شناخته شده است (۵). سالمونلا انتریکا سروارهای انتریتیدیس و تایفی موریوم عامل بروز اغلب موارد شیوع سالمونلوز در انسان می‌باشند (۶). جهت تعیین حضور سالمونلا در مواد غذائی استفاده از روش کشت مرسوم مستلزم صرف وقت به مدت حداقل ۶-۵ روز می‌باشد (۷). روش‌های سریع مانند استفاده از پروب‌های DNA و یا RNA، روش‌های ایمیونولوژیک و روش هیبریداسیون اسید نوکلئیک فاقد حساسیت و ویژگی مناسب می‌باشند (۸). امروزه روش PCR ابزار مناسب در تشخیص‌های میکرو بیولوژیکی می‌باشد. در استفاده از روش PCR جهت تشخیص جنس سالمونلا و گونه‌های مختلف آن ژن‌های زیادی مورد هدف قرار گرفته است. ژن‌ها حدت کرموزمی مانند invA (۹)، ژن‌های حدت پلاسمیدی مانند ipaB (۱۰)، ژن‌های فعالیتی مانند iroB (۱۱)، ژن‌های رمزکننده سنتز فلاژلین مانند fliC (۱۱) و ژن فیمبریال مانند Prot6E (۱۲) از جمله این هدف‌ها می‌باشند.

هدف از انجام این مطالعه تعیین آلودگی آب مورد استفاده در سیستم خنک کننده لاشه طیور به باکتری‌های جنس سالمونلا در کشتارگاه صنعتی شهرستان مشهد با استفاده از روش کشت استاندارد و تایید نشخیص و همچنین تعیین درصد حضور سروارهای انتریتیدیس و تایفی موریوم به روش Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس سالمونلا و هریک از گونه‌های مورد مطالعه بود.

## مواد و روش کار

**نمونه گیری:** در کشتارگاه‌های صنعتی طیور مشهد آب پیش سردکن

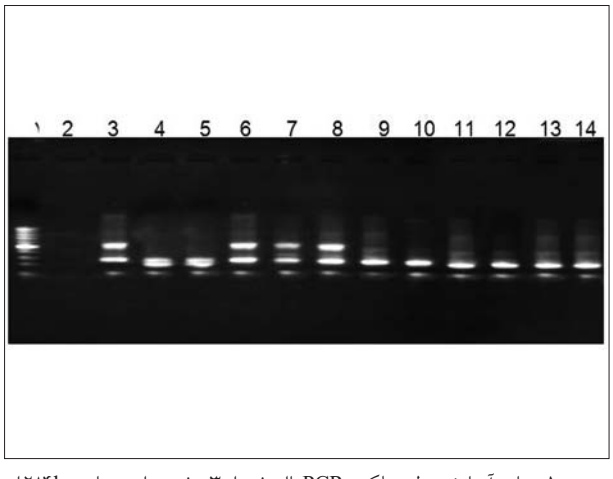
(*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۵۱۱-۸۸۰۲۶۱۴ نمابر: ۰۵۱۱-۶۶۲۰۱۶۶ Email: jamshidi638@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص جنس سالمونلا و سروارهای تایفی موریوم و انتریتیدیس.

| پرایمر | توالی نوکلئوتیدی (32-52) | ژن هدف | اندازه محصول (bp) |
|---|---|---|---|
| S139-F | GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA | Inv A | 284 |
| S141-R | TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C | | |
| Fli15-F | CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T | fliC | 559 |
| Tym-R | ACT CTT GCT GGC GGT GCG ACT T | | |
| Prot6e-5-F | ATATCGTCGTTGCTGCTTCC | Prot6E | 185 |
| Prot6e-6-R | CATTGTTCCACCGTCACTTTG | | |




تصویر ۱- نتایج آزمایش مولتی پلکس PCR بااستفده از ۳ جفت پرایمر: باند ۲۸۴bp از ژن invA اختصاصی جنس سالمونلا، باند ۵۵۹bp از ژن fliC اختصاصی گونه تایفی موریوم، باند۱۸۰bp از ژن Prot6E اختصاصی گونه انتریتیدیس. ستون ۱: مارکر bp۱۰۰ـ ستون۲: کنترل منفی ـ ستون۳: کنترل سالمونلا تایفی موریوم ـ ستون۴: کنترل سالمونلا انتریتیدیس ستون۵: نمونه مثبت سالمونلا انتریتیدیس ـ ستون ۸،۷،۶ نمونه مثبت تایفی موریوم ـ ستون ۹-۱۴: جنس سالمونلا.

هر دوساعت یکبار و آب سردکن(چیلر) هر پنج ساعت یکبار تعویض می‌گردد. در این بررسی تعداد ۵۲ نمونه، از آب منبع، آب پیش سردکن و چیلر کشتارگاه صنعتی طیور مشهد باچهار تکرار به میزان ۵۰ میلی لیتر بوسیله سرنگ استریل نمونه‌برداری انجام شد. با توجه به زمان تخلیه آب در هر قسمت، از آب قسمت پیش سردکن در دو مرحله (انتهای ساعت اول و انتهای ساعت دوم پس از شروع کشتار). از آب چیلر در پنج مرحله (انتهای ساعات اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم پس از شروع کشتار) و در هر مرحله از دو قسمت ابتدا و انتهای آن نمونه‌برداری گردید. نمونه‌ها در شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه ارسال گردید.

**روش کشت مرسوم جهت تعیین حضور سالمونلا:** حجم ۲۵ میلی لیتر از نمونه آب را به ۲۲۵ میلی لیتر محیط کشت پیش غنی کننده لاکتوز براث (Himedia) اضافه نموده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید، سپس یک میلی لیتر از محیط پیش غنی‌سازی شده را در هر یک از محیط‌های براث غنی کننده تتراتیونات (Merck) و سلنیت سیستین (Merck) تلقیح نموده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید و پس از آن در محیط‌های آگارانتخابی سالمونلا شیگلا (Merck) و سبز درخشان SS agar (Merck) و BG agar کشت داده شد و مشابه شرایط قبل گرمخانه گذاری گردید. در انتها با استفاده از محیط‌های تفریقی TSI agar (Merck) و LI agar (Merck)، اوره (Himedia) و محیط آبگوشت تریپتون (Himedia) (تست ایندول)، حضور باکتری سالمونلا مورد تایید قرار گرفت.

**آزمایش مولتی پلکس PCR**: در این آزمایش باکتری سالمونلا تایفی موریوم (ATCC-25923) و سالمونلا انتریتیدیس (ATCC-13076) خریداری شده از شرکت MSTT International، به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

از کلنی‌هائی که در روش کشت مرسوم به عنوان باکتری سالمونلا مورد شناسائی قرار گرفته بود، با استفاده از کیت DNA Prep 100 (DNA Diatom) استخراج گردید و به عنوان الگو در آزمایش m-PCR مورد استفاده قرار گرفت. تست m-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: PCR buffer (۵.۲ µl) (500mM KCl, 200mM Tris HCl)، dNTPs (۲۵.۱ µl) (۱۰mM)، MgCl2 (۱/۵ µl) (2mM)، هریک از پرایمرها (۵.۰ µl)، Taq DNA polymerase (۵.۰ µl) (Fermentase)، DNA استخراج شده (۲ µl). مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و در جدول ۱ آمده است. پرایمرهائی که ژن invA را مورد هدف قرار می‌دهد اختصاصی جنس سالمونلا و پرایمرهائی که ژن‌های fliC و Prot6E را مورد هدف قرار می‌دهند به ترتیب اختصاصی سروارهای تایفی موریوم و انتریتیدیس می‌باشند (۱۲،۱۳). تکثیر ژن‌های هدف در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, icycler) با برنامه سیکلهای حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، و مرحله بسط نهائی در ۷۲ درجه

www.SID.ir

Archive of SID


سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در این بررسی از نشانگر 100bp جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید. محصول نهائی در ژل‌های آگاروز ۱/۲ درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از اشعه UV بررسی گردید.

## نتیجه

در روش کشت مرسوم، تعداد ۱۰ نمونه (۱۹/۲ درصد) که تمامی آنها از نمونه آب چیلر بودند از نظر حضور جنس سالمونلا مثبت تشخیص داده شد. تعداد یک نمونه مربوط به ساعت سوم، تعداد ۴ نمونه مربوط به ساعت چهارم و تعداد ۶ نمونه مربوط به ساعت پنجم قبل از تعویض آب بود. در آزمایش مولتی پلکس PCR نمونه‌هائی که در روش کشت مرسوم به عنوان مورد شناسائی قرار گرفته بود مورد تایید قرار گرفت که از این تعداد، ۳ نمونه به عنوان سالمونلا انتریتیدیس و یک نمونه به عنوان سالمونلا تایفی موریوم مورد شناسائی قرار گرفت (تصویر ۱).

## بحث

چیلرها به منظور سرد کردن و کاهش بار آلودگی لاشه‌ها طراحی شده‌اند، ولی طبق نظر بسیاری از محققین، باکتری‌هایی که در تعداد کمی از لاشه‌ها حضور دارند، ممکن است با انتشار در آب چیلر به سایر لاشه‌ها منتقل شوند (۲). مرحله تخلیه امعا و احشا در پروسه خط کشتار اغلب منجر به پارگی لوله گوارشی گردیده و در نتیجه موجب آلودگی بیشتر باکتریائی لاشه‌ها می‌گردد، این لاشه‌ها می‌توانند به عنوان منبع آلودگی برای سایر لاشه‌ها عمل نمایند (۱۴)، بنابراین لاشه‌ها با میزان آلودگی بالا وارد قسمت‌های بعدی (پیش سردکن و چیلر) می‌گردند.

لاشه‌های طیور که به پیش سردکن و چیلر وارد می‌شوند در صورت آلوده بودن به پاتوژن خاص مانند سالمونلا می‌توانند موجب آلودگی سایر لاشه‌ها گردند. در تحقیقی در ۹ کشتارگاه صنعتی طیور نشان داده شد که ۵/۵ درصد لاشه‌هایی که به چیلر وارد می‌شوند و ۱۱/۶ درصد لاشه‌هایی که از چیلر خارج می‌شوند، آلوده به سالمونلا بودند (۲)، این بررسی نشان می‌دهد که چیلرها نه تنها باعث حذف یا کاهش سالمونلا نمی‌شوند، بلکه خود به عنوان مکانی جهت انتقال متقابل این باکتری بین لاشه‌ها عمل می‌کنند.

استفاده از روش کشت مرسوم در مقایسه با روش PCR در تشخیص جنس سالمونلا از حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد و مستلزم صرف وقت بیشتری می‌باشد (۷) بعلاوه روش مرسوم قادر به تشخیص کلنی‌های خشن سالمونلا نمی‌باشد و با استفاده از این روش نمی‌توان سروارهای مختلف سالمونلا را تشخیص داد (۱۲). در سال ۲۰۰۳ طی یک پروژه تحقیقاتی بین المللی جهت استاندارد نمودن تست PCR در تشخیص پاتوژن‌های مهم، مناسبترین ژن هدف جهت تشخیص جنس سالمونلا ژن invA معرفی گردید، که دارای حساسیت ۹۹/۶ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد می‌باشد (۳). در این بررسی با استفاده از پرایمرهای S141 و S138 که ژن هدف آن invA می‌باشد، جهت شناسائی جنس سالمونلا استفاده گردید. ژن fliC کد کننده فاز ۱ فلاژلین می‌باشد و به اندازه کافی متنوع می‌باشد که می‌توان پرایمرهای اختصاصی جهت تشخیص هر آنتی ژن فلاژلار سالمونلا را طراحی نمود (۱۵). در یک مطالعه با استفاده از تست PCR در تشخیص جنس سالمونلا و سروار تایفی موریوم با استفاده از ژن‌های invA و fliC حساسیت این روش ۹۵ درصد و ویژگی آن ۹۶/۲ درصد گزارش گردید (۱۳). ژن Prot6e یک ژن پلاسمیدی است که اختصاصاً کد کننده فیمبریه سطحی در سالمونلا انتریتیدیس می‌باشد و استفاده از این ژن به عنوان هدف در تشخیص این سروار سالمونلا دارای حساسیت ۹۵ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد می‌باشد (۱۲). در این مطالعه جهت تشخیص دو سروار تایفی موریوم و انتریتیدیس به ترتیب از ژن‌های fliC و Prot6E به عنوان هدف استفاده گردید. امروزه جهت انجام تست PCR تشخیصی، در بسیاری از آزمایشگاه‌ها، استفاده از کنترل تکثیر داخلی (IAC) اجباری می‌باشد، که مشخص کننده حضور احتمالی ممانعت کننده‌های DNA پلیمراز، اشتباه در افزودن اجزاء تست PCR و یا عدم کارکرد مناسب دستگاه حرارتی (thermal cycler) است، ولی استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن invA به همراه سایر پرایمرها که اختصاصی سروارهای مختلف می‌باشد، کارکردی همانند کنترل تکثیر داخلی دارد (۱۲). در این مطالعه ۱۹/۲ درصد از نمونه‌ها آلوده به جنس سالمونلا تشخیص داده شد، که از این تعداد ۳۰ درصد به عنوان سالمونلا انتریتیدیس و ۱۰ درصد به عنوان سالمونلا تایفی موریوم و ۶۰ درصد نیز به عنوان سایر سروارهای سالمونلا تشخیص داده شد. با توجه به حضور سروارهای بیماری‌زای باکتری در آب چیلر و امکان انتقال آن به لاشه‌ها، رعایت اصول بهداشتی، استفاده از ضدعفونی کننده‌های مجاز در آب چیلر جهت کاهش آلودگی لاشه‌ها و نیز سعت جریان آب متقابل حرکت لاشه توصیه می‌گردد.

## References


1. Amavisit, P., Browning, G.F., Lightfood, D., Anderson, C.S. (2001). Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples, Vet. Microbiol.79: 63-74.
2. Capita, R., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, M.C., Moreno. M. (2002). Trisodium Phosphate (TSP) treatment for decontamination of Poultry. Food. Sci. Tech. Int. 8:11-24.


www.SID.ir

Archive of SID


3. Cason, J., Berrang, M., Buhr, R., Cox, N (2004). Effect of pre-chill fecal contamination on numbers of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. J. Food. Prot. 67:1829-1833.
4. Cunningham, F.E., Cox, N.A (1987). Microbiology of Meat. 1st ed. Academic Press INC. p. 193-205
5. Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R.V (2002). *Salmonella* surveillance: a global survey of public helth serotyping. Epidemiol. Infect; 129: 1-8.
6. Herrera-León, S., McQuiston, J. R., Usera, M. A., Fields, P. I., Javier Garaizar, J., Echeita, M. A (2004). Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. J. Clin. Microbiol; 42: 2581-2586.
7. Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H.W., R.S.S. Wu, R.S.S (2002). Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR, Wat. Res. 36: 2802-2812.
8. Malorny, B., Bunge, C., Helmut, R. (2007). A real-time PCR for detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. J. Microbiol. Methods. 70: 245-251.
9. Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003a). Multicenter Validation of the Analytic Accuracy of *Salmonella* PCR: toward an international standard. Appl. Environ Microbiol. 69: 290-296.
10. Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbyoek, L., Bunge, C., Dorn, C., Helmuth, R. (2003b). Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. Inter. J. Food Microbiol, 89: 241-249.
11. Oliveira, S.D., Santos, L.R.D., Schuch, M.T., Silva, A.B.C., Salle, T.P., Canal, C.W. (2002). Detection and identification of *salmonella*s from poultry-related samples by PCR. Vet. Microbiol, 87: 25-35.
12. Rahn, K., DeGrandis, S., Clarke, R., Mcewen, S. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probe. 6: 271-279.
13. Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P (1998). Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* from environmental swabs of poultry houses, Lett. Appl.Microbiol. 28: 113-117.
14. Winfield, M.D., Groisman, E.A (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.69: 3687-3694.
15. Zhu, Q., Lim, C.K., Chan, Y.N. (1996). Detection of *Salmonella* typhi by polymerase chain reaction. J. Appl. Microbiol. 80: 244-251.


www.SID.ir

Archive of SID



J. Vet. Res. 66, 2:149-152, 2011

# CONTAMINATION OF WATER USED FOR CHILLING OF POULTRY CARCASSES TO *SALMONELLA TYPHIMURIUM* AND *SALMONELLA ENTERITIDIS* USING MULTIPLEX-PCR METHOD

**Jamshidi, A.[1*], Naghdipour, D.[2]**

[1]*Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.*

[2]*Graduated from School of Veterinary Medicine. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.*

(Received 14 June 2010 , Accepted 31 January 2011)

***Abstract:***

Poultry products have been recognized as a major source of human illness caused by *Salmonella* serovars. The water content of pre-chiller and chiller in processing line could be the source of cross contamination. Water contents of pre-chillers and chillers, in Mashhad poultry abattoirs are regularly changed every 2 and 5 hours respectively. In this study, a total of 52 water samples were collected from the main tank, the pre-chiller, the initial and the final sections of the chiller in different hours and during four consecutive days. In order to isolate *Salmonella spp*., conventional culture method: including pre- enrichment, enrichment, selective plating and differential plating were performed. To confirm the identification of isolated colonies as *Salmonella spp*. and determining serovars as *Typhimurium* and *Enteritidis* serovars, a multiplex PCR (m-PCR) assay, using three pairs of primers were employed. S141 and S139 for InvA gene, specific for the genus of Salmonella, Fli15 and Tym for *FliC* gene, specific for *Typhimurium* serovar and Prot6e-5 and Prot6e-6 for *Prot6E* gene, specific for *Enteritidis* serovar. Number of ten samples (19.2 %) were determined as contaminated with *Salmonella spp*. All positive samples were from the source of water chiller and the highest rate of contamination was determined in the final hours before refilling of chiller water. In m-PCR assay, number of 1 (1.9%) of isolated colonies were confirmed as *SalmonellaTyphimurium* and number of 3 (5.8%) of isolated colonies were confirmed as *Salmonella Enteritidis*. Considering the presence of pathogenic bacteria in chiller water, using counter flow of water and using disinfectants are recommendable.

**Key words:** *Salmonella spp, Salmonella Typhimurium, Salmonella Enteritidis*, multiplex PCR.

***Corresponding author's email: jamshidi638@yahoo.com, Tel: 0511-8802614, Fax: 0511-6620166**

www.SID.ir