کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶تستی)

هلیکوباکترپیلوری (IgA/IgG)

موارد استفاده :

تعیین نیمه کمّی IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

هلیکوباکترپیلوری میکروب گرم منفی مارپیچی شـــکل ، برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط مارشال و وارن کشـــــف گردید. این میکروب که در معده و دوازدهه انســـــان رشد و تکثیر پیدا می کند، عامل یکی از رایج ترین عفونتهای باکتریال در انسان است.

آلودگی ناشی از H.Pylori در سطح جهان گســـترده بوده و درصد ابتلا به آن ارتباط مستقیم با وضعیت اقتصـادی-اجتماعی جامعه دارد[۱-۳]. در کشـورهای درحال توسعه ۸۰٪ و در کشورهای صنعتی بین ۲۰٪ تا ۵۰٪ از افراد میانسـال به این باکتری آلوده می باشـــند. عفونت مزمن H.pylori در ۱۰۰٪ بیماران مبتلا به زخم معده و دوازدهه[۴-۵]، ۷۰٪ زخم معده[۶-۸] و ۸۰٪ سرطان معده[۹-۱۰] دیده می شود. همچنین درمان و ریشــه کن کردن این میکروب منجر به بهبود التهاب ها ، زخمهای معده و دوازدهه گردد.[۱۱-۱۳]

در واکنش های دفاعی سیستم ایمنی، ایمونوگلوبولین های A و G (IgA و IgG) ضد هلیکوباکترپیلوری نقش مهمی را ایفا میکنند. IgA که قبل از IgG ترشح می شود مانع اتصال باکتری به سلول اپیتلیال می گردد.

امروزه تشـــــخیص این عفونت به طریق Invasive (کشـــــت و آزمایش هیستولوژیکی بیوپسی معده، تست اوره آز) یا noninvasive (تست تنفسـی اوره، بررســـی آنتی ژن در مدفوع، تیتر آنتی بادی یا آنتی ژن در ســـرم) انجام می پذیرد[۱۴].

از بین روشهـــای نامبـــرده اثبات وجود آنتی بادیهای اختصـــــاصـــی ضـــد هلیکوباکترپیلوری توسط تســـتهای ایمونوآنزیماتیک (EIA) به دلیل بالا بودن حســـاسیت و سرعت جوابدهی از روشهای تشـــخیصــــی ارجح بوده و پیگیری بیماریهای فوق الذکر را میسر می سازد[۱۵-۱۶].

تعیین کمـــی غلظت IgA می تواند به عنـــــوان تســـــت تائیدی IgG ضـــد هلیکوباکترپیلوری باشد. همچنین این اندازه گیری در تشـخیص عفونت افرادی که قادر به ترشح IgG ضد هلیکوباکتری نمی باشند حائز اهمیت است.

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه‌گیری نیمه کمّی IgA/IgG ضـــــد هلیکوباکترپیلوری بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیســـــــتم ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی ژن های هلیکـــوباکترپیلوری،کالیبراتـــورها، کنترل ها و نمـــونه های رقیق شـــده بیمـــاران افـــزوده می شـــود. در حین انکوباسیون اول،IgA/IgG ضـــد هلیکوباکترپیلوری موجود در نمونه‌ها به آنتی ژن های هلیکوباکتر متصـــــل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شســـتشـــو از سیســـــتم خارج می‌شوند. پس از شستشــــو، آنتی‌بادی ضـــد IgA/IgG انســـــانی که به آنـــزیم پراکســـیداز (HRP) متصــــــل شده است به حفـــره‌ها افزوده می‌شود. بعـد از دومین انکـوباسیون و شستشـــو، افـــزودن سوبسترای TMB (۳و۳'-۵و۵' تترامیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شـده با میزان IgA/IgG ضـد هلیکوباکترپیلوری موجود در نمونه‌ها نسـبت مسـتقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه می یابد و رنگ آبی ایجاد شـده به رنگ زرد مبدل می‌شـود. شـدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصـــــــوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

III. محتویات کیت :

محلولهای این کیت(Cat.No.P-HAG) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشـه آن درج شده است . دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می باشد .

۱. پلیت: پلیت ۹۶ حفره ای پوشـــش داده شــــده با آنتی ژن تخلیص شـــــده هلیکوباکترپیلوری.

۲. کالیبراتورصـــــفر : ۱ ویال ۲ میلی لیتری کالیبراتور حاوی PBS، پـروتئین و تیمروزال.

۳. کالیبراتورها(آماده مصرف) : ۳ ویال ۱ میلی لیتری کالیبراتور حاوی IgA ضـد پیلوری، PBS، پروتئین و تیمروزال. مقادیر IgA ضـد پیلوری کالیبراتورها (برحسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۴. کالیبراتورها(آماده مصـــرف) : ۳ ویال ۱ میلی لیتری کالیبراتور حاوی IgG ضـد پیلوری، PBS، پروتئین و تیمروزال. مقادیر IgG ضـد پیلوری کالیبراتورها (برحسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۵. کنترل ها(آماده مصــــــرف) : ۲ ویال ۱ میلی لیتری کنترل مثبت و منفی سرمی حاوی IgA ضد پیلوری انســــــانی، پروتئین و تیمروزال. ۲ ویال ۱ میلی لیتری کنترل مثبت و منفی سرمی حاوی IgG ضد پیلوری انســـانی، پروتئین و تیمروزال .مقادیر IgA و IgG ضد پیلوری کنترل ها (برحسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۶. ردیاب آنزیمی (ضد IgG): یک ویال ۶ میلی لیتـری آنتـی بادی منوکلنال ضد IgG انسانی،متصــــل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافـــر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۷. ردیاب آنزیمـــی(ضد IgA): یک ویال ۴ میلـی لیتـری آنتـی بادی منوکلنال ضد IgA انسانی،متصــــل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافـــر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۸. بافر رقیق کننده نمونه : دو ویال ۲۵ میلی لیتری محلول PBS، پروتئین و تیمروزال.

۹. محلول شســـــتشـــــوی غلیظ (x۲۰): یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی PBS-Tween20 و تیمروزال.

۱۰. محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۱۱. محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلـــی لیتـــری H_2SO_4 دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو .

۲. دستگاه اسـپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر .

۳. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۵۰۰ - ۱۰ میکـرولیتـر و تیپ های یک بار مصرف.

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری، سـرم یا پلاســمای هپارینه بیمار می باشـــد . این نمونه ها به مدت یک تا دو هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری اسـت . برای نگهداری نمونه ها به مدت طولانی تر ، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده ، در ۲۰- درجه سـانتی گراد نگهداری نمائید . بهتر اسـت از ذوب شـدن و یخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب نمود . برای اندازه گیری IgA/IgG نمونه های منجمد شـــده ، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده ، ســـپس با حرکت دســـت یکنواخت نمائید . برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex نباید اســـتفاده نمود.

VI. آماده سازی محلول ها :

۱. نمونه های سرم را به کمک **بافر رقیق کننده نمونه** به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق کنید ۱۰ میکرولیتر نمونه به ازاء ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده).

۲. محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیســت با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شســــتشـــــوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شســــتشـــــوی رقیق را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد می‌توان نگهداری کرد.در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

VII. روش کار :

کالیبراتورها و کنترل های کیت آماده مصرف بوده
و برخلاف سرم ها نیاز به رقیق کردن ندارند.

قبل از شروع کار دمای تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد. 0 ۲۰

۱. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه های ســـرمی رقیق شـــده راداخل حفره های مربوطه ریخته ، پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برای تســـت IgA یا IgG از کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه های سرمی مربوطه استفاده نمائید.

۲. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید .

۳. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضـــد IgA یا IgG افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید.

۴. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۵. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید

۶. پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید .

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفـره بـریـزید و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید .

۸. میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسـیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده ، بخوانید.

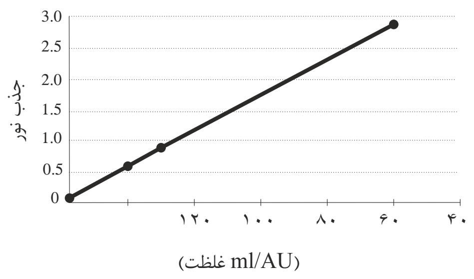
VIII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری کالیبراتورها و نمونه ها و ترســـیم منحنی مقدار IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری بیماران قابل محاسبه اسـت . در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صـــورت دســـتی ترســـیم می شـــود، محور Y شـــاخص میزان جذب نور کالیبراتورها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شـــــــــــاخص مقادیر کالیبراتورها برحســـب AU/ml می باشد . نتایجی که در جدول زیر آمده ، فقط به عنوان مثال بوده و نبایســـــتی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

IgA

مقدار IgA ضد هلیکوباکترپیلوری(AU/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۴	کالیبراتور A
۲۰	۰/۵۹	کالیبراتور B
۳۰	۰/۸۷	کالیبراتور C
۱۰۰	۲/۸۴	کالیبراتور D
۴۲/۵	۱/۲۲	سرم

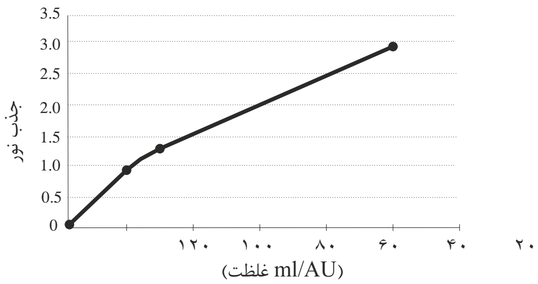
برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



IgG

مقدار IgG ضد هلیکوباکترپیلوری(AU/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۲	کالیبراتور A
۲۰	۰/۹۰	کالیبراتور B
۳۰	۱/۲۹	کالیبراتور C
۱۰۰	۲/۸۹	کالیبراتور D
۴۳/۹	۱/۶۱	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



IX. اعتبار آزمایش:

آزمایش انجام شده در صورتی معتبر است که شرایط زیر را دارا باشد :

۱. جذب نوری کالیبراتور B بیشتر از ۰/۲ باشد.

۲. کنترل مثبت و منفی ارائه شده در کیت در محدوده مورد نظر قرائت گردد.

۳. جذب نوری کالیبراتور D بیشتر از ۱ باشد.

فقدان شرایط مذکور نشـــان دهنده احتمال تخریب مواد و یا به وقوع پیوستن خطای آزمایش می باشد. در این صورت توصیه می شود، آزمایش تکرار گردد.

X. تفسیر نتایج:

با توجه به نتایج بدست آمده از جذب نوری سرم بیماران، نمونه ها را می توان در سه گروه، به شرح ذیل دسته بندی نمود:

۱. نمونه های منفی: نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها پائین تر از جذب نوری و یا ارزش کالیبراتور B باشد، منفی تلقی میشوند. بیمارانی که نمونه ســـرم آنها منفی گزارش می شـــود یا فاقد آنتی بادی های IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری بوده و یا مقدار این آنتی بادی ها پائین تر از حدی است که با این کیت قابل اندازه گیری باشد.

۲. نمونه های مشکوک: نتایج نمونه هایی که میـزان جذب نوری و یا غلظت آنها مابین کالیبراتور B و C باشد قابل تفسیر نبوده و تست بایســتی به فاصلهٔ چند روز تکـــرار شود . در صـــورت تائید جواب مشـــکـــوک، انـــدازه گیری IgA/IgG ضد این باکتری به روش های دیگر پیشنهاد می گردد.

۳. نمونه های مثبت: نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها برابر یا بیش از کالیبراتور C باشــــد، دارای آنتی بادی های IgA/IgG ضـــــد هلیکوباکترپیلوری بوده و بیمار می تواند مبتلا به هلیکوباکترپیلوری باشــــد. مثبت بودن نتیجه آزمایش لزوماً نشانگر وجود بیماری گوارشی نمی باشد.

تفسیر نتایج	AU/ml	مقادیر IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری
منفی	<۲۰	<Calibrator B
مشکوک	۲۰-۳۰	Calibrator B-Calibrator C
مثبت	>۳۰	>Calibrator C

XI. مقادیر طبیعی:

IgA.I

بررسـیهای انجام گرفته بر روی ۲۷۱ نفر (تهران) که فاقد هر گونه علائم بیماریهای گوارشی بوده اند نشـان دهنده آن است که سرم ۳۱٪ از افراد نرمال بالای ۲۵ سال حاوی IgA ضد پیلوری می باشد.

از آنجایی که میزان آلودگی با میکروب هلیکوباکترپیلوری، بسـتگی به سن، منطقه جغرافیائی و شرایط اجتماعی و اقتصادی دارد، توصیه می گردد که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن مقدار IgA ضـــد هلیکوباکترپیلوری افراد ســـالم، Cut-off آن را تعیین نموده و از آن بعنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

IgG.II

بررسـیهای انجام گرفته بر روی ۲۷۱ نفر (تهران) که فاقد هر گونه علائم بیماریهای گوارشی بوده اند نشـان دهنده آن است که سرم ۶۴٪ از افراد نرمال بالای ۲۵ سال حاوی IgG ضد پیلوری می باشد.

از آنجایی که میزان آلودگی با میکروب هلیکوباکترپیلوری، بسـتگی به سن، منطقه جغرافیائی و شرایط اجتماعی و اقتصادی دارد، توصیه می گردد که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن مقدار IgG ضـــد هلیکوباکترپیلوری افراد ســـالم، Cut-off آن را تعیین نموده و از آن بعنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

XII. ویژگی های اختصاصی تست:

IgA.I

۱. حساسیت و اختصاصی بودن : برای بررسی حساسیت و اختصاصی بودن کیت EIA پادتن علم، IgA ضد هلیکوباکترپیلوری ۶۵۱ نمونه تصـــادفی با کیت پادتن علم و کیت مورد تائید FDA اندازه گیری گردید.

مقایسه نتایج به دست آمده در جدول زیر آمده است:

کیت مورد تائید FDA		کیت پادتن علم −	کیت پادتن علم −/+	کیت پادتن علم +
	−	۳۴	۳	۱۹
	−/+	۴	۳۲	۹
	+	۱۳	۷	۲۲۳

۲. دقت : شاخص دقت کیت با مقایســـــــه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌ســـنجی (Inter-assay) و درون‌ســـــنجی (Intra-assay) تعیین گردیده اســـت. برای این منظور ۳ نمونه ســـرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌ســـنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌ســـنجی) تعیین غلظت شـــده اســـت. نتایج انحراف معیار (SD) و ضـــریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است :

جدول شاخص دقت

درون سنجی %CV	درون سنجی SD	درون سنجی میانگین (ml/AU)	میان سنجی %CV	میان سنجی SD	میان سنجی میانگین (ml/AU)
۵/۸	۵/۲	۹۱/۰	۳/۰	۲/۷۳	۹۱/۲
۹/۰	۲/۲	۲۴/۹	۸/۵	۲/۲۷	۲۶/۵
۱۱/۸	۰/۳۶	۳/۱	۱۱/۹	۰/۳۷	۳/۱

IgG.II

۱. حساسیت و اختصاصی بودن : برای بررسی حساسیت و اختصاصی بودن کیت EIA پادتن علم، IgA ضد هلیکوباکترپیلوری ۸۴۲ نمونه تصـــادفی با کیت پادتن علم و کیت مورد تائید FDA اندازه گیری گردید.

مقایسه نتایج به دست آمده در جدول زیر آمده است:

کیت مورد تائید FDA		کیت پادتن علم −	کیت پادتن علم −/+	کیت پادتن علم +
	−	۳۲۱	۶	۱۳
	−/+	۳	۵۴	۸
	+	۱۸	۷	۴۱۲

۲. دقت : شاخص دقت کیت با مقایســـــــه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌ســـنجی (Inter-assay) و درون‌ســـــنجی (Intra-assay) تعیین گردیده اســـت. برای این منظور ۳ نمونه ســـرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌ســـنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌ســـنجی) تعیین غلظت شـــده اســـت. نتایج انحراف معیار (SD) و ضـــریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است :

جدول شاخص دقت

درون سنجی %CV	درون سنجی SD	درون سنجی میانگین (ml/AU)	میان سنجی %CV	میان سنجی SD	میان سنجی میانگین (ml/AU)
۲/۷	۱/۰	۳۷/۵	۵/۰	۱/۳	۷۷/۳
۳/۰	۰/۴	۱۵/۹	۴/۱	۱/۲	۳۳/۶
۹/۴	۰/۹	۱۰/۵	۹/۰	۰/۹	۱۰/۶

XIII.References

1-Malaty HM, Graham DY . Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacterpylori infection. Gut 35:742,1994

2.Marshall, B.J. and J.R. Warren. Unidentified curved bacillin in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lanceti:1311 1904.

۳.Duck, G.E. Campylobacter pylori and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol. Rev. 3:1 1990.

۴.Graham DY. Campylobacter pylori as a Pathogenetic Factor in Duodenal Ulcer the Case for. Scand. J. Gastroenterol. 24 (supple. 160): 46,1989.

۵.Vaira D et a l. Four hour rapid urease test (RUT) for detecting Campylobacter pylorf. is it reliable enough to start treatment? J. Clin. Pathol. 41: 355,1900.

۶.Price AD. Histological Aspects of Campylobacter pyloriCoionisalion and Infection of Gastric and Duodenal Mucosa. Scand. J. Gastroenterol. 23 (supple. 142): 21,1980.

۷.Dooley CP and Cohen H. Ann. Intern. The Clinical Significance of Campylobacter pylori. Med. 100:70,1900.

۸. Parsonnet J et al. Helicobacter pylori I nfe c i o n and the Risk of Gastric Carcinoma. N. Engl. J. Med. 325:1127,1991.

۹.Nomura A et al. Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N. Eng. J. Med. 325:1132,1991.

۱0.Vails J et al.Disappearance of Gastritis after Eradication of Helicobacter pylori. Scand. J. Gastroenterol. 26:1057,10U1.

۱1.Marshall DJ et al. Prospective Double-Blind Trial of Duodenal Ulcer Relapse after Eradication of Campytobacter pyfori. Lancet, ii: 1437,1900.

۱2.SeppHlfi KM et al. Triple Therapy of Helicobacter pylori Infection in Peptic Ulcer. A 12-Month Follow-up Study of 93 Patients.Scand. J. Gastroenterol. 27: 973,1992

۱3.QDZZOM F. Key paints from the revised Maastricht Consensus Report: the impact on general practice. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13:Suppl 2:S3-s7. [Medline]

۱4.Evans, D.J. Jr., D.G. Evants, D.Y. Graham, and P.D. Klein. A sensitive and specific serologic test for detecting uf Campylobacter pylori infection . Gastroenterology. 96:1004. 1989.

۱5.Nuwull, D.G.. Identification uf thu uuter mambrsncu proteins uf Campy/ubactQr pyloridis and antigenic cross-re activity between C. pytoridia and C. jejuni. J. Gen. Microbiol. 133:163, 1907.

۱6.Tolltiy, N.J., D.G. Newell, J.E. Ormand, H.A. Carpenter, W.R. Wilson, A.R. Zinsmuister, G.I. Perez-Perez, and M.J. Dlasor. Serodi agnosia of Helicobacter pytorf. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. J. Clin. Microbiol 29:1635,1991.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انســـانی و حیوانی هســـتند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دســتکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشــــیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul 2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان سرپرست(کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)