

شیوع آنتی بادی IgA یرسینیا در اهداکنندگان خون به روش سرولوژی اختصاصی و کشت خون

حسین تیموری نقده^۱، ابوالفضل دبیر مقدم^۲، زینب پیرمحمد جماعت^۳، رقیه شریفی^۴

چکیده

سابقه و هدف

یرسینیا آنتروکولیتیکا، باکتری بالقوه خطرناکی در انتقال خون می باشد که می تواند سبب سپتی سمی، شوک اندوتوکسیک، DIC و مرگ گردد. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع سرمی یرسینیا در اهداکنندگان خون و این که آیا سروپوزیتیوی می تواند دال بر عفونت یرسینیایی باشد، بود.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی در سه ماهه اول سال ۱۳۹۰ در پایگاه انتقال خون تهران در اهداکنندگان خون انجام شد. ابتدا از اهداکنندگان طبق روند جاری خونگیری به عمل آمد و متعاقباً بر روی سرم آن ها (لوله پیلوت)، آزمایش anti-YOP IgA Antibody به روش الیزا انجام شد. سپس از کیسه خون اهداکنندگان سروپوزیتیو نگهداری شده به مدت ۳۵ روز در دمای ۶-۱ درجه سانتی گراد کشت به عمل آمد. در پایان روز هفتم انکوباسیون، محیط های کشت از نظر رشد میکروب مورد بررسی قرار گرفتند. یافته ها توسط آزمون ANOVA و نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

در این بررسی ۴۹۲ اهداکننده سالم بررسی شدند. شیوع سرمی یرسینیا در اهداکنندگان سالم در تهران به روش الیزا ۱۲/۶٪ گزارش گردید. این میزان با آزمایش تاییدی و سترن بلات به ۸/۵٪ کاهش یافت و کشت کیسه های خون اهداکنندگان سروپوزیتیو از نظر یرسینیا، همگی منفی گردیدند.

نتیجه گیری

در بررسی حاضر، کشت خون همه اهداکنندگان سالم یرسینیا سروپوزیتیو (anti-YOP IgA)، منفی بود. نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعه های مشابه، غربالگری با استفاده از anti-YOP IgA EIA را که در بعضی مقالات به آن اشاره شده و سبب حذف تعداد زیادی اهداکننده سالم می شود، از طرفی اثر بسیار منفی در چرخه خون می گذارد، رد می کند.

کلمات کلیدی: یرسینیا آنتروکولیتیکا، سپتی سمی، اهداکنندگان خون

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

۱- مؤلف مسؤول: متخصص آسیب شناسی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۲- کارشناس ارشد میکروب شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه ای آموزشی انتقال خون تهران - تهران - ایران

مقدمه

یرسینیا انتروکولیتیکا، باکتری روده‌ای و یکی از عوامل مهم بیماری‌های دستگاه گوارش می‌باشد. این باکتری در یک سوم موارد، به صورت عفونت بدون علامت بوده و یک منبع بالقوه خطر است که در غربالگری اهداکندگان شناسایی نمی‌شود و هنوز هم یکی از علل مرگ و میر در تزریق خون ناشی از شوک اندوتوکسیک می‌باشد (۱-۳).

عفونت با سوش پاتوژنیک آن در هر رده سنی اتفاق می‌افتد. ولی بیماری بالینی اغلب در بچه‌ها و جوانان گزارش شده است (۴). عفونت بدون علامت در بالغین شایع است و با خوردن آب یا غذای آلوده به مدفوع انسان یا حیوان، منتقل می‌شود (۵، ۴). یرسینیا دارای پروتئین‌های متعددی است که از طریق آن‌ها می‌تواند به میزبان آسیب رساند، در میان این پروتئین‌ها (آنتی‌ژن‌ها)، گروه (Yersinia YOPs PROTEINS (Outer Membrane که پروتئین‌های خارجی یرسینیا هستند، سبب آسیب میزبان می‌گردند (۷-۴). بعد از ابتلا به عفونت با تحریک مخاط میزبان، به میزان فراوان آنتی‌بادی‌های IgA، IgM و IgG بر علیه لیپوساکاریدها و پروتئین‌های YOPs یرسینیا تولید می‌شود، این آنتی‌بادی‌ها کاملاً محافظت کننده نبوده و در ۳۰٪-۲۰٪ موارد، عفونت به صورت نامشخص تداوم پیدا می‌کند (۸، ۷). IgG ضد یرسینیا به مدت طولانی در خون باقی مانده و نشانگر ابتلای افراد در گذشته می‌باشد، IgA دارای نیمه عمر کوتاه (۶-۵ روز) است (۴). یرسینیا در محیط غنی از آهن تکثیر یافته و تزریق چنین خونی می‌تواند سبب سپتی سمی، شوک اندوتوکسیک، DIC و مرگ گردد (۹، ۴).

از سال ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۲، ۳۳ مورد اندوتوکسمی ناشی از یرسینیا در انگلیس مشاهده شده که سبب مرگ ۱۹ نفر شده است (۴).

از سال ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۶، ۱۰ مورد مرگ و میر ناشی از یرسینیا در امریکا به دنبال تزریق خون گزارش شده است (۴). بین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۷، ۷۰۰۰۰۰ مورد تزریق گلوبول قرمز در نیوزلند صورت گرفت. ۱۰ مورد سپتی سمی یرسینیا بروز کرد که ۶ مورد آن با مرگ همراه بود (۴). در بررسی که در استرالیا در سال ۲۰۰۶ از جمعیت سالم به عمل آمد، شیوع سرمی یرسینیا در سنین مختلف

بین ۳۸٪ - ۴٪ بود (۱۰). شیوع سرمی یرسینیا در امریکا در جمعیت سالم در سال، ۱/۴٪ با تیترا بالا و در اسکاندیناوی ۴٪ گزارش شده است (۴). در آلمان شیوع سرمی حدود ۴۰٪ گزارش شده است (۷). تاکنون در انتقال خون ایران بررسی در مورد یرسینیا در اهداکندگان و یا خون‌های اهدایی انجام نشده است. در این مطالعه، ابتدا شیوع سرمی یرسینیا در جمعیت اهداکندگان خون با الایزا و با کیت اختصاصی anti YOP IgA Immunoassay بررسی شد و سپس خون اهداکندگان سروپوزیتیو با آزمایش اختصاصی وسترن بلات و کشت خون ارزیابی گردید و در آخر، این دو روش (کشت و الایزا) با هم مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود و در سه ماه اول سال ۱۳۹۰، در پایگاه انتقال خون تهران و ستاد مرکزی انجام شد. حجم نمونه با توجه به حداقل شیوع سرمی یرسینیا یعنی ۲۴٪ در جمعیت سالم، تعداد ۴۹۲ اهداکنده سالم (بدون سابقه اسهال اخیر و یا عدم تماس نزدیک با افراد مبتلا به عفونت گوارشی) انتخاب شد. سپس از آن‌ها طبق روند جاری به میزان 45 ± 45 میلی‌لیتر در کیسه‌های حاوی CPDA-1 خونگیری به عمل آمد. بر روی سرم آن‌ها (سرم به دست آمده از لوله پیلوت)، آزمایش anti-YOP IgA به روش الایزا (کیت recomwell IgA از میکروژن آلمان) انجام شد. در بررسی حاضر از کیت آماده الایزا، تولیدی شرکت میکروژن آلمان که در آن آنتی‌ژن‌های متعدد سطح یرسینیا انتروکولیتیکا (آنتی‌ژن‌های YOP) به کار گرفته و کوت شده است، استفاده گردید. کیت مربوطه دارای کنترل منفی، کنترل مثبت و کنترل cut off می‌باشد. تشخیص در این کیت بر اساس cut off که در بروشور کیت توصیف گردیده است، می‌باشد. به طور خلاصه مراحل الایزا به ترتیب شامل تهیه کنترل‌ها و نمونه‌های کاری، انکوباسیون، شستشو، ریختن کونژوگه، انکوباسیون، شستشو، ریختن سوبسترا، ریختن محلول stopping و خوانش محلول نهایی در طول موج ۴۵۰ nm می‌باشد. سپس جهت تایید، سرم افراد سروپوزیتیو به روش وسترن بلات (کیت recomline IgA از میکروژن آلمان) آزمایش

افراد سروپوزیتیو (۶۲ مورد) بعد از ۳۵ روز نگهداری در یخچال منفی شدند.

بحث

با وجود غربالگری اهداکنندگان از نظر یرسینیا (مصابحه با اهداکنندگان)، هنوز هم بروز باکتری و سببی سمی ناشی از عفونت یرسینیا به دنبال تزریق خون آلورژیک و اتولوگ گزارش می شود که عده ای آن را به عفونت بی علامت نسبت می دهند (۴). بعد از عفونت یرسینیا، تحریک موضعی اپیتلیوم دستگاه گوارش سبب پاسخ ایمنی و تولید فراوان آنتی بادی ضد یرسینیا از نوع IgA، IgM و IgG بر علیه آنتی ژن های لیپولی ساکاریدی (LPS- lipopolysaccharide) و پروتئین های سطحی یرسینیا (YOP) می شود.

برای شناسایی عفونت یرسینیایی، از روش های مختلف از جمله کشت مدفوع و خون استفاده می شود. اخیراً برای بررسی های اپیدمیولوژیک و هم چنین شناسایی منشأ عفونت در اهداکنندگان خون که خونشان سبب باکتری می یا سببی سمی در گیرنده خون شده، آزمایش های سرولوژی یرسینیا توصیه شده است (۴).

انواع آزمایش های سرولوژی مورد استفاده شامل آگلوتیناسیون لوله ای، روش همآگلوتیناسیون، ایمونوفلوئورسانس، الایزا و رادیو اسی می باشد. روش آگلوتیناسیون لوله ای نتایج مثبت کاذب فراوانی دارد (۱۱).

در این مطالعه شیوع سرمی anti-YOP IgA Yersinia antibody در اهداکنندگان سالم انتقال خون تهران به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. برای اولین بار است که شیوع سرمی یرسینیا در اهداکنندگان خون ایران گزارش و میزان سروپوزیتیوی با کشت خون مقایسه می شود.

در این مطالعه از anti-YOP IgA EIA که برای گونه یرسینیا خیلی اختصاصی است، با نام کیت recomwell Yersinia IgA استفاده شد. این کیت از پروتئین های غشاء خارجی یرسینیا به روش ریکامیننت ساخته می شود. برای انجام این مطالعه، الایزا روش مناسب و دقیقی بود و یکی از روش های الایزا که اخیراً به آن توجه زیادی

شدند. در مرحله بعد کیسه خون اهداکنندگان سروپوزیتیو را جدا کرده و به مدت ۳۵ روز در دمای ۶-۱ درجه بالای صفر نگهداری کردیم. به این صورت که ۲۰ میلی لیتر خون از یکی از ورودی های کیسه خون با سرنگ استریل تهیه و به دو محیط کشت خون بی فازیک، هر یک جداگانه ۱۰ میلی لیتر تلقیح نمودیم. یکی از محیط های کشت را در دمای اتاق و ظرف دیگر را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته نگهداری کردیم. در پایان روز هفتم زمان انکوباسیون، محیط های کشت از نظر رشد میکروب مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

در این بررسی ۴۹۲ اهداکننده خون از نظر anti-YOP IgA مورد آزمایش سرمی قرار گرفتند. سرم ۶۲ اهداکننده از نظر anti-YOP IgA Antibody مثبت شدند یا به عبارت دیگر ۱۲/۶٪ اهداکنندگان از نظر یرسینیا سروپوزیتیو بودند. از این میان، ۶۰ نفر از آن ها مرد (۹۶/۷٪) و ۲ نفر زن (۳/۳٪) بودند. حداقل سن افراد ۱۹ و حداکثر ۶۲ سال (۱۱/۳۵ SD= بود) (جدول ۱).

جدول ۱: توزیع موارد مثبت یرسینیا اتروکولیتیکا بر حسب سن با الایزا

گروه های سنی بر حسب سال	موارد مثبت	درصد سنی	تعداد زن	تعداد مرد
۱۹-۲۹	۱۳	۲۰/۹۶	۲	۱۱
۳۰-۴۰	۱۶	۲۵/۸	-	۱۶
۴۱-۵۱	۱۷	۲۷/۴	-	۱۷
۵۱-۶۲	۱۶	۲۵/۸	-	۱۶

بر روی ۶۰ نمونه سروپوزیتیو، آزمایش وسترن بلات با کیت recomline Yersinia IgA (میکروژن، آلمان) انجام شد که ۴۲ مورد (۸/۵٪) مثبت شدند. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که ۸/۵٪ از اهداکنندگان خون تهران با وسترن بلات از نظر یرسینیا سروپوزیتیو هستند. کشت کیسه خون

شده، استفاده از آنتی ژن های پروتئینی سطح یرسینیا (YOP) می باشد که در پلاسמיד آن کد می شود و عامل پاتوژنیستی میکروب مذکور است. این آنتی ژن فقط به یرسینیا انتروکولیتیکا و یرسینیا سودو تو برکولوزیس اختصاص دارد (۴). دلیل استفاده از Anti-YOP IgA EIA در الایزا، نیمه عمر کوتاه (۶ روز در مقابل ۲۳ روز IgG)، پاسخ سریع به عفونت یرسینیا و تولید دایمی آن در برابر عفونت بدون علامت است (۴).

Anti-YOP IgA EIA به عنوان نشانه عفونت یرسینیا در همه نمونه های خونی که سبب اندوتوکسمی شده، مشاهده شده است (۴).

anti-YOP IgA حساسیت و اختصاصیت معناداری نسبت به LPS EIA دارد (۴).

۱۲/۵٪ از اهداکندگان سالم خون در مرکز خون تهران به روش الایزا سروپوزیتو بودند. میزان شیوع سرمی به روش الایزا در فنلاند و آلمان به ترتیب ۱۹٪ و ۳۳٪ بود (۹). در آزمایش تاییدی و سترن بلات که بر روی اهداکندگان سروپوزیتو تهران انجام شد، میزان شیوع از ۱۲/۶٪ در اهداکندگان سالم به ۸/۵٪ کاهش یافت. در آلمان و فنلاند، میزان شیوع در آزمایش خون اهداکندگان سالم (نه فقط اهداکندگان سروپوزیتو بلکه تمامی اهداکندگان) با و سترن بلات افزایش نشان داد (به ترتیب ۳۱٪ و ۴۳٪). درصد بالای شیوع IgA در اهداکندگان سالم در آلمان، وجود عفونت های نهانی زیاد یرسینیا را در این جوامع مطرح می سازد (۷). در بررسی دیگر که در مجارستان و بر روی ۱۱۲ اهداکنده خون سالم انجام شد، شیوع سرمی یرسینیا انتروکولیتیکا با Anti-YOP IgA EIA ۱۵/۱٪ گزارش شد که با آزمایش تاییدی ایمونو بلات به میزان ۹/۸٪ کاهش یافت (۱۲). در مطالعه دیگری که در اهداکندگان شهری در نیوزلند انجام گردید، میزان شیوع یرسینیا انتروکولیتیکا به روش الایزای مرسوم، ۲/۱٪ گزارش گردید (۱۳).

کشت خون کیسه های سروپوزیتو اهداکندگان سالم (۶۲ مورد) پایگاه تهران بعد از ۳۵ روز نگهداری، منفی گزارش شد. در مطالعه دیگری که در نیوزلند بر روی ۴۹۵ اهداکنده سالم از نظر کشت خون به عمل آمد، نتیجه

مشابه به دست آمد و همگی منفی شدند (۴). در حالی که ۴٪ آن ها از نظر سرمی دارای Anti-YOP IgA EIA مثبت بودند. در یک گزارش موردی توسط هولن و همکاران از سپتی سمی یرسینیایی که به دنبال تزریق خون رخ داده بود، آن ها نمونه همه اهداکندگان را از نظر Anti-YOP IgA EIA مورد آزمایش قرار دادند. در مطالعه آن ها یکی از اهداکندگان سروپوزیتو بود و در کشت مدفوع وی، یرسینیا رشد کرده بود. ولی با وجود این در آنالیز DNA، یرسینیای نمونه اهداکنده با گونه یرسینیای بیمار متفاوت گزارش گردید (۱).

نتایج اپیدمیولوژیک در دنیا نشانگر میزان شیوع عفونت در جوامع می باشد. هر چه میزان شیوع سرمی بالاتر باشد، نشانه این است که آن بیماری در جامعه شایع تر است که می تواند در افزایش آلودگی خون ها مؤثر باشد (۴).

با توجه به نادر بودن باکتری می (۱ در ۶/۵ میلیون در فرانسه و ۱ در ۹ میلیون در امریکا)، انجام غربالگری با anti-YOP IgA EIA با هدف کاهش خطر یرسینیا در اهداکندگان سالم کار بیهوده ای است زیرا می تواند در افزایش فوق العاده هزینه و حذف تعداد بالای اهداکنده اثرات منفی داشته باشد.

با وجود این در بعضی از گزارش ها برای شناسایی منشا باکتری می در گیرندگان خون، وقتی که کشت خون و مدفوع اهداکنده منفی می گردد، Anti-YOP IgA مثبت را ملاک می دانند (۴). به همین جهت در بعضی از کشورها مثل زلاندنو که به دنبال تزریق صد هزار کیسه خون یک بار سپتی سمی بروز می کند، خون اهداکندگان را با Anti-YOP IgA EIA آزمایش می کنند و در صورت سروپوزیتو بودن، اهداکنده را رد می کنند. البته این کار میزان رد اهداکندگان را از ۲/۵٪ به ۶/۵٪ افزایش می دهد. یادآوری می گردد در سایر مطالعه ها، غربالگری خون ها با این آزمایش توصیه نگردیده است.

در ایران میزان اهداکندگان عفونی مردود شده به وسیله پرسش و پاسخ ۱/۶٪ می باشد در حالی که اگر از کیت فوق استفاده شود، ۱۲/۵٪ به مردودی ها افزوده می شود. در این صورت سبب کاهش شدید ذخیره خونی می گردد در حالی که هیچ گونه توجیه علمی ندارد.

نتیجه گیری

علاوه بر هزینه بالا، سبب مردود شدن بیشتر اهداکنندگان سالم می گردد. لذا کماکان سؤال و جواب از اهداکنندگان جهت حذف افراد مشکوک به یرسینیا هنوز از موارد استاندارد غربالگری محسوب می شود.

با وجود شیوع نسبتاً بالای سروپوزیتیویتی یرسینیا در اهداکنندگان، هیچ توجیه علمی جهت غربالگری اهداکنندگان با کیت Anti-YOPIgA EIA وجود ندارد زیرا

References :

- 1- Hoelen DW, Tjan DH, Schouten MA, Dujardin BC, van Zanten AR. Severe *Yersinia enterocolitica* sepsis after blood transfusion. *Neth J Med* 2007; 65(8): 301-4.
- 2- Jacobs J, Jamaer D, Vandeven J, Wouters M, Vermeylen C, Vandepitte J. *Yersinia enterocolitica* in donor blood: a case report and review. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5): 1119-21.
- 3- Hoogkamp-Korstanje JA, de Koning J, Heesemann J. Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection* 1988; 16(2): 81-5.
- 4- Kendrick CJ, Baker B, Moris AJ, O'Toole PW. Identification of *Yersinia*-infected donors by anti-Yop IgA immunoassay. *Transfusion* 2001; 41(11): 1365-72.
- 5- Hanski C, Naumann M, Grützkau A, Pluschke G, Friedrich B, Hahn H, et al. Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1991; 59(3): 1106-11.
- 6- Aleksic S, Burwitz K, Bockemühl J, Aleksic V. Immune response to flagellar antigens in human infections with *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* 1991; 12: 110-6.
- 7- Mäki-Ikola O, Heesemann J, Toivanen A, Granfors K. High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany. *Rheumatol Int* 1997; 16(6): 227-9.
- 8- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(4): 1315-52.
- 9- Gibb AP, Martin KM, Davidson GA, Walker B, Murphy WG. Modeling the growth of *Yersinia enterocolitica* in donated blood. *Transfusion* 1994; 34(4): 304-19.
- 10- Tomas H, Mooseder G, Al Dahouk S, Bartling C, Scholz HC, Strauss R, et al. Seroprevalence of anti-*Yersinia* antibodies in healthy Austrians. *Eur J Epidemiol* 2006; 21(1): 77-81.
- 11- Prentice M. Transfusion *yersinia enterocolitica*. *BMJ* 1992; 305(6855): 663-4.
- 12- Sonnevend A, Cziráok E, Pál T. *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies in Hungarian blood donors. *Folia Microbiol (Praha)* 2005; 50(3): 269-72.
- 13- Morris AJ, Woodfield DG. Antibody screening for recent *Yersinia enterocolitica* infection in blood donors. *Transfusion* 1998; 38(5): 511-2.

Original Article

The Prevalence of *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies in Iranian blood donors evaluated by specific serology and blood culture methods

Timori Naghadeh H.¹, Dabir Moghaddam A.¹, Pirmohammad Jamaat Z.¹, Sharifi R.^{1,2}

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The recombinant *Yersinia* uses YOPs (*Yersinia* outer membrane proteins) produced by recombinant techniques that are highly specific for the genus *Yersinia*. The aim of this study is to determine the prevalence of *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies in 492 healthy blood donors and make comparison between seropositivity and the presence of *y.enterocolitica* infection in blood donors.

Materials and Methods

In the descriptive study, sera from 492 healthy Iranian blood donors were studied for *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies by two different techniques, enzyme immunoassay (EIA) and western blot to determine the prevalence of *Yersinia* antibody. Secondly, we cultured the whole blood of *Yersinia* seropositive donors which has been stored in 1-6° C for 35 days. Thirdly, we compared the rate of seropositivity with the results of donors' blood cultures.

Results

The prevalence rates of *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies in Tehran healthy blood donors were 12.5% and 8.5% by EIA and Western Blot, respectively. The blood cultures of all seropositive donors were negative.

Conclusions

Although the prevalence rate of *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies in Iranian healthy blood donors was high there was no correlation whatsoever between seropositivity and donors' bacteremia.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, Septicemia, Blood Donors

Received: 28 May 2014

Accepted: 28 Feb 2015

Correspondence: Timori Naghadeh H., Pathologist. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 1157-14665, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601564; Fax: (+9821) 88060717
E-mail: timori13@gmail.com