

کیت سنجش آنتی بادی IgG ضد HSV ۱، ۲ به روش الایزا

مقدمه :

هرپس ویروس ها شامل گروه بزرگی از ویروس های DNA دار و از شایع ترین عوامل عفونت های انسانی در تمام جهان هستند. عفونت ویروسی هرپس سیمپلکس توسط دو نوع مختلف ویروس تیپ ۱ و تیپ ۲ ایجاد می شود. ویروس تیپ ۱ (HSV ۱) بیشتر نواحی غیر تناسلی و تیپ ۲ (HSV ۲) بیشتر نواحی تناسلی را گرفتار می کنند. به عفونت ایجاد شده بوسیله ویروس تیپ ۱ تبخال غیر تناسلی (cold sore) گفته می شود و ابتلای به آن از سنین پایین شروع می شود. به طوری که ۹۰ درصد افراد تا قبل از ۵ سالگی با ویروس تماس پیدا می کنند. در این بیماری، معمولاً لب ها، لثه ها و ناحیه دهان، ندرتاً قرنیه، و گاهی ناحیه تناسلی بوسیله تاول های بسیار کوچک و دردناک گرفتار می شوند. اگر چشم نیز دچار عفونت شود، علایمی چون درد و قرمزی چشم، احساس این که در چشم چیزی وجود دارد، حساسیت به نور، و ریزش اشک بروز می کنند. ویروس از طریق تماس فرد به فرد یا تماس با ترشحات بزاقی، چشمی، ادرار یا مدفوع انتقال می یابد. تاول ها و زخم های تب خال تا زمانی که بهبود نیافته باشند مسری هستند. ویروس تیپ ۲ اغلب تبخال های تناسلی ایجاد می کند و تماس با آن بیشتر در دوران بعد از بلوغ و شروع فعالیت جنسی است. علائم بیماری معمولاً ۴ تا ۷ روز بعد از تماس با فرد حامل ویروس یا ترشحات حاوی ویروس بروز می نماید. البته، در اغلب موارد، ابتلا بدون علامت می باشد. عفونتهای بدون علامت HSV می تواند در دوران حاملگی و در افراد سالم رخ دهد. همچنین عفونتهای هرپسی در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و بیماران تحت درمان با داروهای ایمنوساپرسیو معمول می باشد. شایع ترین علامت بیماری تبخال تناسلی، در صورت ایجاد، پیدایش تاول های کوچک آبدار در ناحیه تناسلی است که بعداً پاره می شوند و زخم های دردناکی ایجاد می کنند. در خانم ها ممکن است ترشحات آبی واژینال هم مشاهده شود. در برخی افراد به دنبال انتشار ویروس به دستگاه عصبی علائمی همچون تب، سردرد، استفراغ و سفتی گردن ۳ تا ۱۲ روز بعد از ضایعات تناسلی ایجاد می شود. علاوه بر تماس جنسی، تماس پوست با ترشحات تنفسی افراد آلوده می تواند باعث انتقال عفونت های تبخالی شود لذا شاعلین حرف خاصی از جمله دندانپزشکان، کارکنان بیمارستان ها و آزمایشگاه ها در معرض خطر بیشتری برای اکتساب بیماری های تبخالی هستند. همچنین انتقال از مادر به فرزند در حین زایمان یکی از راههای مهم انتقال است. آنتی بادیهای HSV ۱، ۲ معمولاً ۶-۴ هفته پس از عفونت افزایش یافته و سپس در طی زمان کاهش می یابند. جداسازی آنتی بادی اختصاصی تولید شده بر علیه آنتی ژنهای اختصاصی این ویروس در تشخیص عفونت حاد یا مزمن، در غیاب علائم کلینیکی مهم می باشد.

اساس آزمایش :

در این کیت آنتی ژنهای HSV ۱، ۲ به داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای HSV ۱، ۲ این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. سپس با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد HSV ۱، ۲ از نوع IgG، آنتی هیومن IgG نیز به آنها متصل می گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است. افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت :

- ۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای HSV ۱، ۲ (HSV 1,2 coated plate).
- ۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): دو ویال هر یک حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها.
- ۳) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز.
- ۴) استانداردها (Standards set): ۵ ویال استاندارد شامل غلظت های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ AU/ml از آنتی بادی ضد HSV ۱، ۲ از نوع IgG (استاندارد صفر و ۱۰ حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱/۵ میلی لیتر می باشند).
- ۵) سرم کنترل (Control Serum): یک ویال شامل ۱/۵ میلی لیتر سرم حاوی IgG علیه HSV با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف).
- ۷) محلول شستشو (Wash Solution): یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰.۵٪ توئین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک یک نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۹۴۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

ویرایش چهارم - خرداد ۹۳



مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

- ۱) دستگاه الایزایدردارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپله‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
- ۲) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری Anti- HSV 1,2 IgG در سرم و پلاسماهای انسانی طراحی و ساخته شده است .
- ۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
- ۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادیهای ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

شرایط نگهداری :

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
- ۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید . پایداری پلیت پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- ۴) جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر رقیق کنید (بطور مثال می توان ۵۰ میلی لیتر از محلول شستشوی غلیظ را با آب مقطر به حجم یک لیتر رساند) . قابل ذکر است که پس از تهیه محلول شستشوی آماده مصرف می توان آنرا یک هفته در یخچال نگهداری کرد و پس از یک هفته ، دیگر قابل استفاده نمی باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود ، نمونه میتواند برای مدت دو روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود .

توضیحات عمومی :

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .
- ۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
- ۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- ۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را در وسط و ته چاهکها بریزید .
- ۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می باشد. بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود .

مراحل انجام آزمایش :

- ۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- ۲) نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده نمونه) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

ویرایش چهارم - خرداد ۹۳



توجه: استانداردها و کنترل کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند.

- ۳) ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های رقیق شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید:
- ۴) ۱۰ چاهک ردیف اول استانداردها و در ۲ چاهک بعد سرم کنترل را به صورت دوپلیکیت و به ترتیب بریزید. سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید.
- ۵) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه کنید.
- ۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله و یا سرنگ استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو، چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.
- ۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها بریزید.
- ۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- ۸) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۵).
- ۹) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به چاهکها اضافه نمایید.
- ۱۰) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید.
- ۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزاریدر با فیلتر ۴۵۰nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد.

ارزشیابی آزمایش:

- این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد:
- میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای استاندارد صفر. در صورت بیشتر بودن این جذب نوری احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته و یا محلول کروموژن کیت آلوده شده است. آزمایش را دوباره انجام داده، در مراحل شستشو دقت کرده و محلول کروموژن را از نظر وجود رنگ آبی بررسی کنید.
 - میانگین جذب نوری استاندارد ۱۰ باید بیشتر از استاندارد صفر باشد.
 - میانگین جذب نوری بیشتر از ۱/۵ برای استاندارد ۲۰۰ ضروری است. جذب نوری کمتر از ۱/۵ برای استاندارد ۲۰۰ بیانگر خراب شدن استاندارد و یا کیت است. در این حالت تاریخ انقضاء کیت و استاندارد را بررسی کنید.

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود.
جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید.

الف) محاسبه کمی:

- ۱) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورید. نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی استاندارد رسم شود.
- ۲) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را به دست آورده و روی محور عمودی محل آن را پیدا کنید. نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و سپس از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی رسم کنید. نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

دریک جمعیت نرمال، مقدار cut-off معادل استاندارد ۱۰ AU/ml می باشد. مقادیر پایین تر از این مقدار منفی و بالاتر از این مقدار مثبت تلقی می شوند. افرادی که مقدار آنتی بادی آنها بین ۱۱- ۹ AU/ml می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم و یا پلاسما تاز مجدداً آزمایش شوند.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

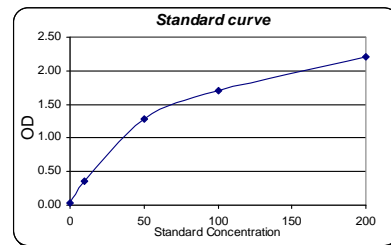
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

ویرایش چهارم - خرداد ۹۳



نمونه جذب نوری استاندارد ها و نمودار حاصله :

جذب نوری	استانداردها (AU/ml)
۰/۰۳	۰
۰/۳۶	۱۰
۱/۲۸	۵۰
۱/۷۰	۱۰۰
۲/۲۰	۲۰۰



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

ب) محاسبه کیفی :

۱) جهت محاسبه مقدار Cut-off ، میانگین جذب نوری استاندارد ۱۰ AU/ml را بدست آورید :

$$\text{Cut-off value} = \text{Mean OD of standard 10 AU/ml}$$

۲) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی ، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه ها بر مقدار Cut-off بدست آورید :

$$\text{Cut-off Index (COI)} = \text{OD of sample} / \text{Cut-off value}$$

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند . نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها ۱/۱ - ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسماي تازه مجدداً آزمایش شوند .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت :

۲۵۰ عدد سرم مثبت تایید شده به روش کمی لومینسانس و الایزای مرجع توسط این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت این کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgG علیه HSV ۱،۲ در صد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت :

تعداد ۱۲۰ نمونه سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با کیت حاضر همگی منفی بودند . براساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۱۰۰ درصد می باشد .

۳) دقت آزمایش :

جهت بررسی تکرار پذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله سرم منفی ، مثبت و مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

ویرایش چهارم - خرداد ۹۳



– آزمون دقت درون سنجی (Intra-assay) :

CV%	SD	میانگین غلظت (AU/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	نمونه منفی
۸/۶	۰/۳	۳/۵	۲۰	نمونه منفی
۳/۸	۵/۲	۱۳۷	۲۰	نمونه مثبت ۱
۶/۴	۰/۹	۱۴	۲۰	نمونه مثبت ۲

– آزمون دقت میان سنجی (Inter-assay) :

CV%	SD	میانگین غلظت (AU/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	نمونه منفی
۹/۲	۰/۳۷	۴/۰	۱۰	نمونه منفی
۴/۲	۶/۱	۱۴۶	۱۰	نمونه مثبت ۱
۶/۷	۱/۰	۱۵	۱۰	نمونه مثبت ۲

*هر سری آزمایش، به صورت دوپلیکیت انجام شده است.

References:

- 1- ENGVALI.E and PERLMANN.P.(1997) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin. J.immuochemistry (8) 871-874 .
- 2- Brooks Georf, Butel Janet, S.Jawetz,melnick & Adelbery's medical microbiology twenty second edition. Mc Grow-Hill 2001 .
- 3- Murray Patrick, R.Rosenthal, Ken. S.Kobayashi, George S. Medical Microbiology fourth Edition...mosby 2002 .
- 4- Roizman B, Knipe DM. Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Raven Press; 2001. p. 2399–2460 .
- 5- Munday, PE; Vuddamalay, J; Slomka, MJ; Brown, DW. Role of type specific herpes simplex virus serology in the diagnosis and management of genital herpes. Sex Transm Infect. 1998 Jun;74(3):175–178 .

روش انجام آزمایش HSV1,2 IgG به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای HSV ۱،۲			
نمونه	سرم کنترل	استانداردها	محلولها
-	-	۱۰۰ میکرولیتر	استانداردها
-	۱۰۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۱۰۰ میکرولیتر	-	-	نمونه رقیق شده
دهانه چاهکها را با برجسب مخصوص پلیت بیوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برجسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	کنژوگه آماده مصرف
دهانه چاهکها را با برجسب مخصوص پلیت بیوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برجسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

ویرایش چهارم – خرداد ۹۳

