کیت سنجش Free PSA به روش الایزا

مقدمه :

آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) جزئی از خانواده آنزیم کالیکرئین با وزن ملکولی حدود ۳۰ کیلو دالتون است که دارای فعالیت آنزیمی مشابه کیموتریپسین می باشد . این گلیکو پروتئین منومر در اپی تلیوم غده پروستات تولید و به طور طبیعی به داخل مایع سمینال ترشح شده و عملکرد آن تجزیه پروتئینهای وزیکولهای سمینال و حل کردن لخته سمینال است. این آنتی ژن اولین بار در سال ۱۹۷۹ توسط Wang و همکارانش شناسایی و تخلیص شد. غلظت این آنتی ژن در افراد مبتلا به سرطان پیشرفته پروستات و بزرگی خوش خیم پروستات (BPH) افزایش پیدا می کند. PSA در سرم به چندین شکل وجود دارد. یک نوع که از نظر فعالیت ایمنی کارایی نداشته و توسط آلفا–۲– ماکروگلوبولین احاطه شده است. نوع دیگر PSA در سرم با یک نوع مهار کننده پروتئاز به نام آلفا –۱– آنتی کیموتریپسین (ACT) کمپلکس تشکیل داده است. با وجودی که ACT فقط به جایگاه فعال PSA متصل می شود، PSA با تست های ایمنی قابل تشخیص است. شکل سوم PSA با وزن مولکولی پایین (حدود ۳۰ کیلو دالتون) که نمایانگر یک پرو آنزیم یا شکل غیر فعال از نظر آنزیمی و کمپلکس با ACT نیست، PSA آزاد یا Free PSA نام دارد . نسبت دو فرم کمپلکس و آزاد PSA در افراد مختلف تفاوت دارد. از نظر پزشکی مقدار PSA-ACT و Free PSA زمانی که با مقدار کل PSA یا Total PSA مقایسه شود، نقطه تمایز بین کانسر پروستات و بزرگی خوش خیم پروستات (BPH) است. مطالعات نشان داده است که بین بیمارانی که مقدار Total PSA آنها بین ۴ تا ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر است، نسبت PSA آزاد به Total PSA در آقایان دارای سرطان پروستات پایین تر از آنهایی است که به بزرگی خوش خیم پروستات مبتلا هستند. با این وجود لازمه تشخیص سرطان پروستات فقط بیوپسی بوده و آزمایش Total PSAو Free PSA در جهت کمک به تصمیم گیری پزشک برای انجام بیوپسی دارای اعتبار است .

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک Free PSA پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود. پس از انکوباسیون و شستشو، آنتی بادی ثانویه ضد PSA متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد که مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت Free PSA در نمونه ها متناسب است، پس از شستشو محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) وکروموژن است به داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکهاست. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد Free PSA (Anti-Free PSA Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) سری استانداردها (Standards Set) : شامل شش ویال استاندارد با غلظتهای صفر ، ۰/۳ ، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر Free PSA کالیبره شده در مقابل استاندارد ۹۶/۶۶۸ IS 1^{st} WHO (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند) .
۴) سرم کنترلهای بالا و پایین : دو ویال هر یک حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۵) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۷) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) . 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 .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

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

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
۲) سمپلر های ۲۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده 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 اول – مهر ۹۲

۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های 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 .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضاء نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه را می توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود و در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه نیز پرهیز شود. پیشنهاد می شود که از نمونه های همولیز، لیپمیک و کدر استفاده نشود ولی مطالعه بر روی نمونه های همولیز شده (تا غلظت ۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر هموگلوبین)، نمونه های لیپمیک (تا غلظت ۱۱/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تری گلیسیرید) و نمونه های حاوی بیلی روبین تا غلظت ۲۰ میلی گرم بر دسی لیتر اثر تداخلی بر روی سنجش ندارند .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و بخوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
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) 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 محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه به طول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

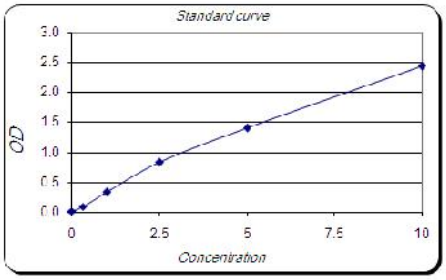
۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) ۲۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسی بافر (Assay Buffer) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸–۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله 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 میکرو لیتر 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 بزنید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ – ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۴) .
۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
۸) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

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 اول – مهر ۹۲

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) 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 بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید ، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

استانداردهای Free PSA (ng/ml)	جذب نوری nm (۴۵۰/۶۳۰)
0	0.02
0.3	0.1
1	0.34
2.5	0.83
5	1.41
10	2.44



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 .

مقادیر مورد انتظار:

با مطالعه بر روی ۲۰۰ نمونه سرم مردان سالم مقدار طبیعی Free PSA با کیت شرکت پیشتاز طب به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر طبیعی خود را بدست آورد :

محدوده طبیعی با ۹۵٪ حدود اطمینان
Up to 0.9 ng/ml

زمانی که غلظت Total PSA بین ۴ تا ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر باشد، نسبت Free PSA به Total PSA، نقطه تمایز بین کانسر پروستات و بزرگی خوش خیم پروستات است . بسته به نسبت، احتمال سرطان پروستات می تواند به صورت زیر باشد. با این وجود لازمه تشخیص سرطان پروستات فقط بیوپسی بوده و آزمایش Total PSA و Free PSA در جهت کمک به تصمیم گیری پزشک برای انجام بیوپسی دارای اعتبار است. برای محاسبه درصد Free PSA نمونه، لازم است که غلظت Total PSA و Free PSA همان نمونه را با کیتهای شرکت پیشتاز طب تعیین کرد . سپس با تقسیم Free PSA به Total PSA ضربدر عدد ۱۰۰ ، درصد Free PSA را بدست آورید .

درصد احتمال سرطان پروستات	نسبت Free PSA به Total PSA
۵۶	صفر تا ۱۰ درصد
۲۸	۱۰/۱ تا ۱۵ درصد
۲۰	۱۵/۱ تا ۲۰ درصد
۱۶	۲۰ تا ۲۵ درصد
۸	بیش از ۲۵ درصد

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و دو برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت Free PSA قابل تشخیص در این کیت ۰/۰۵ ng/ml می باشد .

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

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۴ سرم با غلظتهای مختلف Free PSA انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۰/۱۸	۰/۰۱۱۳	۶/۲۸
۲	۲۴	۰/۵۵	۰/۰۲	۳/۶۴
۳	۲۴	۱/۵۸	۰/۰۵۸	۳/۶۷
۴	۲۴	۷/۴۳	۰/۲۸	۳/۷۷

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۰/۱۷۷	۰/۰۱۵۳	۸/۶۴
۲	۲۴	۰/۵۵۸	۰/۰۳۴	۶/۰۹
۳	۲۴	۱/۷۳	۰/۱	۵/۷۸
۴	۲۴	۵/۹	۰/۳۱	۵/۲۵

۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از Free PSA به نمونه های سرمی با غلظتهای مشخص Free PSA افزوده شده و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است (جهت تست ریکاوری از استانداردهای کیت استفاده نشود) :

نمونه	مقدار FreePSA موجود در سرم (ng/ml)	مقدارافزوده شده Free PSA (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکاوری (%)
۱	۵/۴	۰/۱۲۸	۲/۷۶	۲/۸۳	۱۰۲/۵
۱	۵/۴	۰/۴۹	۲/۹۴	۳	۱۰۲
۱	۵/۴	۱/۶	۳/۵	۳/۴	۹۷/۱
۲	۰/۱۲۸	۱/۶	۰/۸۶۴	۱/۰۱	۱۱۶/۸
۲	۰/۱۲۸	۰/۴۹	۰/۳۰۹	۰/۲۹۷	۹۶/۱
۳	۴/۱۸	۵/۸	۴/۹۹	۴/۸۳	۹۶/۸
۳	۴/۱۸	۰/۱۶۲	۲/۱۷	۲	۹۲/۱
۳	۴/۱۸	۱/۷۴	۲/۹۶	۲/۸۴	۹۵/۹
۴	۰/۷۲	۵/۸	۳/۲۶	۲/۸۳	۸۶/۸
۴	۰/۷۲	۰/۵۶	۰/۶۴	۰/۶	۹۳/۷
۴	۰/۷۲	۰/۱۶۲	۰/۴۴	۰/۴۴	۱۰۰
۴	۰/۷۲	۱/۷۴	۱/۲۳	۱/۲۱	۹۸/۳۷
۵	۰/۱۷۲	۵/۸	۲/۹۸۶	۲/۸۴	۹۵/۱
۵	۰/۱۷۲	۰/۵۶	۰/۳۶۶	۰/۳۳	۹۰/۱۶
۵	۰/۱۷۲	۰/۱۶۲	۰/۱۶۷	۰/۱۵	۸۹/۸
۵	۰/۱۷۲	۱/۷۴	۰/۹۵۶	۰/۸۸	۹۲

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

٤) خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی از ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از Free PSA تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار Free PSA موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	ریکاوری (%)				
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۳۲
۱	۷/۰۹	۱۰۰	۹۷/۷	۹۷/۱	۹۰/۴	۱۱۴
۲	۵/۳۷	۹۴/۸	۹۴/۵	۸۴/۲	--	--
۳	بیش از ۱۰	--	۱۰۴	۱۰۶	۱۰۸	۱۲۲

٥) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش Free PSA جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۱۲ µg/ml) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

٦) اختصاصیت :

واکنش متقاطع در سرم هایی با غلظت بسیار بالا از آنالیت های AFP (10 µg/ml) ، CEA (5 µg/ml) ، HCG (50000 IU/L) و PSA-ACT با کیت Free PSA مشاهده نشد .

References:

Belanger A, van Harbeek H, et al. Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen.Studies for establishment of an international PSA. Prostate 1995; 27: 187-197

Zhov A.M, Tewari P.C, card weu G.W. Multiple forms of PSA in serum; differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assay.Clin. Chem. 1993;39: 2483

Jonathan McDemed, Using PSA intelligently to manage prostate cancer. PCRI Insights, August 2005 vol. 8, no.3

روش انجام آزمایش بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد Free PSA			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۲۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۲۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۲۰ میکرولیتر
اسی بافر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند ، سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید و طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید و طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
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 اول – مهر ۹۲