آلودگی آب استخرهای پرورش ماهی و ماهیان قزل‌آلای پرورشی به برخی باکتری‌های روده‌ای در استان چهارمحال و بختیاری

مجتبی بنیادیان[۱]، حسن فریدی‌زاد[۲]، آوا اکبریان[۳*] و عفت کریمی‌قهفرخی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۰

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین میزان آلودگی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آب استخرهای پرورش ماهی استان چهار محال و بختیاری به برخی باکتری‌های روده‌ای انجام شد. تعداد ۱۰۸ نمونه ماهی از ۶ استخری پرورش ماهی در فصل تابستان به صورت کاملاً تصادفی گرفته شد، هم‌چنین ۲۴ نمونه از آب استخرها در دو مرحله جمع‌آوری گردید. همه‌ی نمونه‌ها جهت جداسازی باکتری‌های سالمونلا، اشریشیا *کلی* و *سیتروباکتر فروندی*، با استفاده از محیط‌های کشت غنی کننده و انتخابی آزمایش شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ کدام از نمونه‌ها (ماهی و آب) به باکتری سالمونلا آلودگی نداشتند اما آلودگی نمونه‌های ماهی به اشریشیا *کلی* و *سیتروباکتر فروندی* به ترتیب برابر با ۲۰/۳ و ۷/۴ درصد بود. هم‌چنین آلودگی نمونه‌های آب استخرها به اشریشیا *کلی* و سیتروباکتر به ترتیب برابر با ۶۶/۷ درصد و صفر درصد بود. با توجه به نتایج این بررسی، ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در این ناحیه یک منبع ایجاد سالمونلوز در انسان محسوب نمی‌شوند، ولی احتمال انتقال آلودگی برخی از سویه‌های بیماری‌زای باکتری اشریشیا *کلی* توسط این منبع غذایی به انسان وجود دارد.

کلمات کلیدی: ماهی قزل‌آلا، باکتری روده‌ای، سالمونلا، اشریشیا *کولای*، *سیتروباکتر فروندی*

مقدمه

امروزه با رشد سریع جمعیت در جهان و کاهش ذخایر ماهیان، نیاز شدیدی به تکثیر و پرورش آبزیان احساس می‌شود. این نیاز باعث افزایش چشمگیر پرورش متراکم ماهیان گوناگون در سطح جهان شده است. از طرفی مرغوبیت گوشت آبزیان و کیفیت پروتئینی مناسب آن‌ها که سرشار از اسیدهای آمینه‌ی ضروری بدن می‌باشند و بیش‌تر بودن میزان اسیدهای آمینه‌ی ضروری لیزین، ترئونین و تریپتوفان آن‌ها نسبت به گوشت قرمز نیز دلیل دیگری بر توسعه‌ی این صنعت است (رکنی ۱۳۸۳).

عفونت سالمونلایی یکی از بیماری‌های مشترک میان انسان و حیوان است و سویه‌های مختلف این باکتری در ایجاد این گونه عفونت‌ها دخیل می‌باشند (Daniella and Crist 2001). سالمونلا باکتری است میله‌ای، گرم منفی از خانواده‌ی آنتروباکتریاسه که اغلب گونه‌های آن به استثنای *سالمونلا پلوروم* و *سالمونلا گالیناروم* به وسیله‌ی تاژک‌های اطرافی متحرک هستند. این باکتری ارگانیسمی است غیراسپورزا و به طور وسیعی در طبیعت پراکنده است و منشاء اصلی آن دستگاه گوارش انسان و حیوان است. تقسیم‌بندی سالمونلاها بر اساس نوع پادگن H و O استوار است و از سیستم کافمن–وایت استفاده می‌شود (رضویلر ۱۳۸۴).

[۱] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

[۲] دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاداسلامی واحدشهرکرد

[۳*] دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد E-mail: Awa_vet@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

هرچند که امروزه مرگ و میر ناشی از سالمونلوز کاهش یافته است، با وجود این، ایجاد حالات مقاوم و حامل در افراد مبتلا وجود دارد. بیماری‌های ناشی از سالمونلا در دام‌ها نیز علاوه بر انتقال میکروب به انسان، خسارات اقتصادی فراوانی را از جمله کاهش تولید و تحمیل هزینه‌های درمانی بالا در پی دارد.

سالمونلوز در انسان باعث بروز تب روده، گاستروانتریت حاد، باکتریمی و عفونت‌های موضعی و مزمن به خصوص در دستگاه گوارشی و تناسلی می‌گردد. سایر باکتری‌های روده‌ای مانند *اشریشیا کلی* و سیتروباکتر نیز قادرند در افراد، موجب عفونت‌های روده‌ای و یا خارج روده‌ای شوند و بهداشت انسانی را به خطر بیندازند (Schmidt et al. 1992).

استخرهای پرورش ماهی به دلیل این که به راحتی توسط آب‌های سطحی و فاضلاب انسانی و دامی آلودگی پیدا می‌کنند، به عنوان مکانی عمده در کنترل و یا شیوع عفونت ناشی از باکتری‌های روده‌ای حائز اهمیت می‌باشند. تحقیق حاضر به منظور تعیین میزان آلودگی آب استخرهای پرورش ماهی و ماهیان قزل‌آلای پرورشی در استان چهارمحال و بختیاری به باکتری‌های سالمونلا، *اشریشیا کلی* و *سیتروباکتر فروندی* به عنوان باکتری‌های روده‌ای و نشانگر آلودگی مدفوعی طراحی و به اجرا درآمد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

در این مطالعه جمعاً ۱۳۲ نمونه شامل ۱۰۸ نمونه از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی از مزارع پرورش ماهی و ۲۴ نمونه آب از ۶ مزرعه فعال پرورش ماهی در فصل تابستان در دو تکرار (با فاصله یک ماه بین هر تکرار برای بررسی آلودگی در یک دوره‌ی پرورشی) گرفته شد. نمونه‌گیری از ابتدای خرداد ماه ۱۳۸۹ شروع و تا اواخر تیر ماه ۱۳۸۹ به طول انجامید. لازم به ذکر است که در مورد نمونه‌گیری از ماهیان مربوط به مزارع پرورشی، به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی ماهی‌ها در اثر انتقال از محل پرورش به آزمایشگاه در همان مکان استخر و با استفاده از قیچی و تیغ اسکالپل در مجاورت شعله، ۲۵ گرم از پوست به همراه عضلات جدا گردید و به محیط آبگوشت لاکتوز منتقل گردید (Varnam 1991).

روش کشت برای باکتری سالمونلا

محیط اولیه‌ی لاکتوز براث بود که در همان ابتدای نمونه‌گیری در محل استخر استفاده شد. تعداد ۲۵ گرم از قطعات پوست و عضله ماهی به طور جداگانه در ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط منتقل شد. هم‌چنین ۱۰ میلی‌لیتر آب استخر در ۹۰ میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده‌ی آبگوشت لاکتوز ریخته شد و ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه‌ی سانتی-گراد قرار داده شد (Varnam 1991).

کشت در محیط غنی‌کننده‌ی انتخابی

برای این منظور محیط سلنیت سیستین براث استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از محیط لاکتوز براث، به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط سلنیت سیستین افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید.

کشت در محیط جامد انتخابی

برای این منظور از محیط سالمونلا شیگلا آگار (SSA) استفاده شد. با استفاده از آنس حلقوی از محیط سلنیت سیستین برداشت و به صورت خطی روی محیط SSA کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. از آنجایی که سالمونلا اغلب لاکتوز منفی می‌باشد کلنی‌های آن روی این محیط بی رنگ یا زرد با مرکز سیاه می‌باشد.

کشت در محیط جامد افتراقی

محیط‌های مورد استفاده اوره، محیط سه قندی آهن دار (TSI) و آگارلیزین آهن دار (LIA) بودند. با استفاده از آنس نوک تیز از کلونی‌های مشکوک به سالمونلا در محیط SSA برداشت و در محیط‌های اوره TSI و LIA کشت عمقی و سطحی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سالمونلا اغلب، در محیط TSI در قسمت ایستاده واکنش اسیدی (رنگ زرد) و هم‌چنین تولید گاز H_2S و در قسمت مورب، واکنش قلیایی (رنگ قرمز) ایجاد می‌نماید. وجود H_2S باعث سیاه شدن قسمتی از محیط می‌شود. علاوه بر این، تست اوره نیز انجام گرفت در صورتی که باکتری اوره مثبت باشد رنگ محیط به بنفش تغییر خواهد کرد. سالمونلا در محیط LIA به دلیل دکربوکسیله کردن اسیدآمینه لیزین رنگ محیط را ارغوانی می‌کند و این مسئله وجه تفریق این باکتری‌ها با باکتری سیتروباکتر می‌باشد. در ضمن باکتری‌هایی که در محیط LIA ایجاد رنگ زرد می‌کردند به عنوان سیتروباکتر فروندی در نظر گرفته شدند (Varnam 1991).

روش کشت برای جداسازی *اشریشیا کلی*

برای جداسازی سایر باکتری‌ها از جمله *E. coli* از محیط پیش غنی کننده به محیط مکانکی آگار انتقال و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کلونی‌های مشکوک به *E. coli* که به رنگ صورتی بودند به محیط‌های افتراقی *Imvic* منتقل شدند و در صورت هم‌خوانی با خصوصیات بیوشیمیایی *E.coli* به عنوان باکتری آلوده کننده انتخاب گردید (Varnam 1991).

نتایج

از بین ۱۳۲ نمونه اخذ شده، ۱۰۸ نمونه ماهیان قزل-آلای پرورشی مزارع و ۲۴ نمونه آب از ۶ مزرعه پرورش ماهی در ۲ تکرار (با فاصله‌ی یک ماهه بین هر تکرار) را شامل می‌شود. نتایج آزمایش‌های میکروبیولوژی روی نمونه‌ها وجود باکتری سالمونلا را تأیید نکرد، اما در برخی از نمونه‌ها، سایر باکتری‌ها مانند *C. freundii* و *E. coli* جدا گردید، به طوری که ۲۰/۳ درصد از نمونه‌های ماهی آلوده به *E. coli* و۷/۴ درصد از آن‌ها نیز به *C. freundii* آلوده بودند. هم‌چنین ۵۰ درصد آب ورودی و ۸۳/۳۳ درصد آب خروجی استخرهای مورد آزمون، آلودگی به *E. coli* را نشان دادند که نتایج کلی آزمون در جداول ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۱: میزان آلودگی ماهیان قزل‌آلای مورد آزمون استخرهای پرورش ماهی به باکتری‌های سالمونلا ، E.coli و C. freundii

گروه استخر	تعداد نمونه	سالمونلا	اشرشیا کلی	سیتروباکتر فروندی
A	۱۸	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
B	۱۸	۰ (٪۰)	۴ (٪۲۲/۲)	۲ (٪۱۱/۱)
C	۱۸	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
D	۱۸	۰ (٪۰)	۴ (٪۲۲/۲)	۰ (٪۰)
E	۱۸	۰ (٪۰)	۶ (٪۳۳/۳)	۳ (٪۱۶/۶)
F	۱۸	۰ (٪۰)	۸ (٪۴۴/۴)	۳ (٪۱۶/۶)

جدول ۲: میزان آلودگی آب استخرهای پرورش ماهی به باکتری‌های سالمونلا، اشرشیاکلی و سیتروباکترفروندی

گروه استخر	نوع نمونه	تعداد نمونه	سالمونلا	اشرشیاکلی	سیتروباکتر فروندی
A	آب ورودی	۲	۰	۰	۰
	آب خروجی	۲	۰	۲	۰
B	آب ورودی	۲	۰	۱	۰
	آب خروجی	۲	۰	۲	۰
C	آب ورودی	۲	۰	۰	۰
	آب خروجی	۲	۰	۰	۰
D	آب ورودی	۲	۰	۲	۰
	آب خروجی	۲	۰	۲	۰
E	آب ورودی	۲	۰	۱	۰
	آب خروجی	۲	۰	۲	۰
F	آب ورودی	۲	۰	۲	۰
	آب خروجی	۲	۰	۲	۰

بحث

در این بررسی که روی ۱۰۸ نمونه ماهی و ۲۴ نمونه آب استخرهای پرورش ماهی صورت گرفت در هیچ کدام از نمونه‌های مورد آزمون، آلودگی به باکتری سالمونلا اثبات نشد؛ اما ۲۰/۳ درصد از ماهیان به باکتری *E. coli* و ۷/۴ درصد از آن‌ها به *C. freundii* آلودگی داشتند. هم‌چنین ۵۰ درصد از آب ورودی استخرها و ۸۳/۳۳ درصد از آب خروجی استخرها به *E. coli* آلودگی داشتند.

طی تحقیقاتی Maarit و Irmeli در سال ۱۹۸۲ در فنلاند، که روی ۲ فارم بزرگ ماهی صورت گرفت، باکتری‌های جدا شده محدود به انتروباکتریاسه، سیتروباکتر و ایروموناس بود و اکثر کلی‌فرم‌های مدفوعی مربوط به سویه‌ی *E. coli* بود. هم‌چنین در آب ورودی استخر *E. coli* وجود نداشت و یا اندک بود، اما در آب خروجی، رسوبات و مدفوع ماهی‌ها *E. coli* دیده شد.

در مطالعه‌ی حاضر باکتری *E. coli* از آب دو استخر جدا نشد. این دو استخر در ارتفاع بیش‌تری نسبت به سایر استخرها قرار داشتند و دلیل عدم حضور باکتری در آب این دو استخر ارتفاع بیش‌تر آن‌ها و امکان کم آلودگی با پساب‌ها می‌باشد. هم‌چنین از آب هیچ یک از استخرهای مورد مطالعه سیتروباکتر جدا نشد که علت آن را می‌توان وفور کم‌تر این باکتری نسبت به سایر باکتری-های روده‌ای دانست.

در سال ۲۰۱۰ طی مطالعه‌ای که در شهر بنین نیجریه توسط Wogo و Maduakor روی ماهیان تازه صید شده از ۲ استخر صورت گرفت، باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، کلبسیلا، سالمونلا، *اشریشیا کلی* و سودوموناس از نمونه‌های پوست، گوشت و آبشش جدا گردید که بیش‌ترین میزان این باکتری‌ها از پوست بود.

Aveeda و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ترینداد و توباگو بیان کردند طی یک بررسی روی ۱۱ استخر پرورش ماهی ۱ درصد از استخرها آلوده به سالمونلا بود، اما از ۵۶۰ نمونه که از ماهیان زینتی موجود در این استخرها گرفته شد، ۲/۳ درصد از آن‌ها به سالمونلا آلوده بودند و *S. javiana* با فراوانی ۹۲ درصد باکتری غالب شناخته شد.

بر اساس مطالعه‌ای در ویتنام توسط Dang ThiThanh Son در سال ۲۰۱۱ *اشرشیا کلی* در استخر پرورشی که در آن از کود خوک استفاده شده بود بیش‌تر از استخری بود که در آن کود خوک استفاده نشده بود. لگاریتم تعداد *اشرشیا کلی* در استخر اول در کپور نقره‌ای، آمور و روهو به ترتیب ۳/۳۲، ۲/۶۳ و ۳/۰۴ بوده و در استخر دوم به ترتیب ۴/۷۵، ۵/۲۵ و ۵/۰۷ بوده است (Dang ThiThanh Son 2011).

در سال ۲۰۰۶ طی مطالعه‌ای که در هانوی ویتنام توسط Ha و Pham روی ۱۷۷ نمونه از غذاهای خام از قبیل سبزیجات، گوشت گوساله، ماهی و مرغ عرضه شده در کارخانجات و رستوران‌ها و بیمارستان‌ها صورت گرفت، میزان آلودگی گوشت ماهی به باکتری *E. coli* ۶/۵ درصد اعلام گردید.

در تحقیقی مشابه توسط Gonzi و همکاران در سال ۲۰۰۲ در اسپانیا، تعداد ۵۴ نمونه از ماهیان بسته‌بندی شده شامل ۳۰ ماهی آزاد دودی و ۲۴ ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای که برای سه هفته در دمای ۱- تا ۲+ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، مورد آزمایش‌های میکروبیولوژی قرار گرفتند. این نمونه‌ها از فروشگاه‌های عرضه کننده‌ی محصولات آبزی تهیه شده بود و در هیچ کدام آلودگی به باکتری سالمونلا و *E. coli* دیده نشد.

سالمونلا در ماهی بیماری ایجاد نمی‌کند، اما اهمیت موضوع در انتقال سالمونلا از ماهی به انسان است که ماهی‌ها ممکن است حامل این باکتری باشند. آلودگی به این باکتری در دریاها و اقیانوس کم‌تر است و بیش‌تر دریاچه و استخرهای پرورشی ماهی ممکن است بر اثر دفع فاضلاب و یا تغذیه‌ی ماهیان استخرهای پرورش ماهی با بقایای کشتارگاهی دچار آلودگی شوند.

بیماری سالمونلوز با وجود پیشرفت‌های فراوان در علوم به ویژه همه‌گیرشناسی هنوز یکی از مسائل مهم بهداشتی در سطح جهانی است. توانایی رشد سالمونلاها در دمای زیر ۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به سروتیپ و گونه‌ی آن وابسته است. سرعت رشد این باکتری در دمای زیر ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خیلی کم است. شاید یکی از دلایل عدم آلودگی آب استخرها به سالمونلا در تحقیق حاضر، پایین بودن دمای آب باشد، زیرا همگی استخرها دارای آب دمای زیر ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بودند.

حمل و نقل مناسب ماهیان پرورشی از استخرها تا محل توزیع نیز می‌تواند از دیگر علل عدم آلودگی به باکتری‌های بیماری‌زا باشد که این امر مستلزم رعایت چند نکته از قبیل نگهداری ماهی‌ها در دمای پایین (معمولاً زیر صفر درجه‌ی سانتی‌گراد) به هنگام حمل و نقل، شست و شوی ظروف مخصوص حمل و نقل ماهی با مواد ضدعفونی کننده و رعایت دیگر نکات بهداشتی است. وضع مطلوب آب استخرها نیز که منبع آن‌ها چشمه می‌باشد، می‌تواند عاملی مهم در نبود عوامل بیماری‌زا در نمونه‌های مورد آزمون باشد، زیرا امکان آلودگی این گونه منابع نسبت به آب‌های جاری (رودخانه‌ها) کم‌تر است.

با توجه به نتایج این مطالعه ماهیان قزل‌آلای پرورشی در انتقال باکتری سالمونلا به انسان نقش مهمی ندارند، ولی انتقال برخی از باکتری‌های بیماری‌زا از جمله *E. coli* به انسان از طریق فرآورده امکان‌پذیر است.

منابع

رضویلر، ودود (۱۳۸۴). میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی، موسسه‌ی انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، صفحات ۳۴- ۴۲ و ۶۰-۷۴.

رکنی، نوردهر (۱۳۸۳). اصول بهداشت مواد غذایی، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، پیشگفتار، صفحات ۶ و ۷.

فرج‌زاده‌آلان، داود (۱۳۷۹). بهداشت مواد غذایی، انتشارات نوربخش و دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، صفحات ۲۴۰، ۲۵۹، ۲۶۰ و ۲۶۱.

Daniella, Z. and Crist, G. (2001). Infection disease. Medical Encyclopedia, 5 (2): 30-33.

Dang ThiThanh Son (2011). Hygiene aspects of manure management and antimicrobial resistance in integrated pig-fish farms in Vietnam. www.susane.info/en/newsletters/SUSANE_Newsletter 19, 19, 1-4.

Gonzi, M.; Otero, A. and Santos, J.A. (2002). Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked fresh water fish at the retail level. Report of Department food hygiene and food technology, Veterinary Faculty, University of Leon, 77 (1-2): 8-161.

Ha T. and Pham T. (2006). Study of salmonella, campylobacter and *Escherichia coli* contamination in raw food available in factories, schools and hospital canteens in Hanoi – Vietnam. Annals of the New York Academy of Sciences, 1081: 262-265.

Maarit, N. and Irmeli, T. (1982). Faecal indicator bacteria at fish farms. Hydrobiologia, 86: 171-175.

Newaj-Fyzul, A.; Adesiyun, A.A. and Mutani, A. (2005). Microbial agriculture disease. Journal of Food Agriculture and Environment, 4 (1): 27-29.

Schmidt, H.; Montag, M.; Bookemuhl, J.; Heesemann, J. and Karch, H. (1992). Shiga-Like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. Infection and Immunity, 61: 534-543.

Varnam, A.H. (1991). Foodborne Pathogens. Wolfe Publishing Ltd, London, UK, pp: 101-128.

Wogu, M.D. and Maduakor, C.C. (2010). Evaluation of microbial spoilage of some aquacultured fresh fish in Benin City Nigeria. Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management, 3: 18-22.

Short paper

Pool water and *Rainbow trout* contamination to some enteric bacteria in Chaharmahal va Bakhtiari province

Bonyadian, M.[1]; Fardizad, H.[2]; Akbarian, A.[3] and Karimi ghahfarokh, F.[3]

Received: 06.10.2013 Accepted: 11.03.2014

Abstract

This study was to determine the rate of contamination of water and cold water fish to some enteric bacteria in Chaharmahal va Bakhtiari province. One hundred and eight of fish samples were randomly gathered from fish farms, also 24 water samples obtained from pools separately in two phases. All samples in order to in order to isolate bacteria including salmonellae, *Escherichia coli* and *citrobacter freundii* were examined by selective and purified culture media.

Results of this study showed that neither of fish nor water samples was contaminated to salmonella, but contamination of fishes to *Escherichia coli* and *citrobacter* were 20.3 and 7.4 percent, respectively. Water contamination to *Escherichia coli* was 66.7 % but there were not any contamination to citrobacter and salmonellae in water samples.

As the result of this study showed, *Rainbow trout* fishes in this area are not considered such as a source for human salmonellosis; however there are some risks that other enteric bacteria such as *Escherichia coli* may involve people by this food stuff.

Key words: *Rainbow trout*, Enteric bacteria, Slamonellae, *E. coli, Citrobacter freundii*

1- Associate Professor, Department of Hygiene and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- DVM Student of Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3- DVM Student of Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Akbarian, A., E-mail: Awa_vet@yahoo.com