

دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی و آب میوه های دست ساز و سنتی

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس جزء عوامل مهم مسمومیت های غذایی می باشد. با توجه به مصرف بالای بستنی و آب میوه در فضول گرم، این مطالعه با هدف بررسی میزان آلودگی بستنی و آب میوه های سنتی شهر گرگان به استافیلوکوکوس اورئوس طراحی و اجرا شد.

روش بررسی: این مطالعه مقطعی، در فصل تابستان ۱۳۹۳ از کلیه آب میوه و بستنی فروشی های سنتی شهر گرگان (۲۵ امکان) انجام شد.

یافته ها: نمونه های مرکز تهیه بستنی و آب میوه سنتی به ترتیب ۵۶ و ۱۴/۲۸ درصد نمونه ها به استافیلوکوکوس اورئوس، ۴۴ و ۳۳/۳ درصد نمونه ها به مخمر، ۲۸ و ۲۸/۵۷ درصد نمونه ها به باسیلوس سرئوس، ۱۲ و ۴/۷۶ درصد نمونه ها به لیستریا، ۱ و ۱۴/۲۸ درصد نمونه ها به باسیلوس سوبلیتیس، ۴ و ۴/۷۶ درصد نمونه ها به باسیلوس لیکتی فورمیس آلدده بودند.

نتیجه گیری: آلودگی بالای بستنی و آب میوه های سنتی به استافیلوکوکوس اورئوس و میکروارگانیسم های مختلف مشاهده شد.

واژه های کلیدی: بستنی، آلودگی مواد غذایی، استافیلوکوکوس اورئوس

مهدی صادقی

استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

ابوالفضل امینی

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشکده پرپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

ناصر بهنام پور

استادیار آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

عبدالوهاب عارفیان

دانشجوی کارشناسی مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

محمد رضا قنبری

کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: مهدی صادقی

پست الکترونیک: kargar@goums.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۱۲۷۷۱۱۹۷

آدرس: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

دریافت: ۹۳/۸/۱۸

ویرایش پایانی: ۹۳/۱۲/۱۲

پذیرش: ۹۴/۱/۱۶

آدرس مقاله

صادقی، امینی، بهنام پور، عارفیان، قنبری م "فراوانی آلودگی استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی و آب میوه های دست ساز و سنتی در شهر گرگان" مجله علوم آزمایشگاهی، خرداد و تیر ۹۴، دوره نهم (شماره ۲): ۹۱

مقدمه

و کیفی آبمیوه ها به ویژه آب میوه های تهیه شده از میوه های در تماس با خاک (هویج و طالی) در فصول گرم سال اهمیت به سزاپی دارد (۵). در مورد آلودگی میکروبی در گرگان یک مورد مطالعه با عنوان ارزیابی آلودگی بستنی سنتی به اشرشیا کلی و انترولاکتریا سه در مراکز تولید و فروش بستنی در سال ۱۳۸۸، صورت گرفته که میزان آلودگی به اشرشیا کلی و انترولاکتریا سه به ترتیب ۳۶ و ۱۱ درصد و در مجموع ۴۰ درصد از کل نمونه های اخذ شده قابلیت مصرف نداشتند (۴). در این بررسی در مورد استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه ای نشده است اما در بقیه نقاط کشور مطالعاتی که در مورد آلودگی استافیلوکوکوس اورئوس شده می توان به مواردی مانند، مطالعه در بستنی های سنتی گتاباد با ۴ درصد آلودگی ۶/۶۷ به استافیلوکوکوس در بستنی های شهر مشهد با آلودگی ۸۰ درصد آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در مورد بستنی و ۹۰ درصد آلودگی به استافیلوکوکوس در آبمیوه های دست ساز این شهر بوده است (۵-۷). با توجه به اینکه استافیلوکوکوس اورئوس جزء عوامل مهم در مسمومیت های غذایی می باشد و با توجه به مصرف بالای بستنی و آبمیوه های دست ساز در فصول گرم سال، این مطالعه با هدف بررسی میزان آلودگی بستنی و آبمیوه های دست ساز به استافیلوکوکوس اورئوس طراحی و اجرا شد.

روش بررسی

این مطالعه به صورت توصیفی - مقطوعی در تابستان ۱۳۹۳ (به دلیل استفاده بیشتر بستنی و آب میوه) در شهر گرگان انجام شد. تعداد اماکن مشمول مطالعه، کلیه آبمیوه فروشی و بستنی فروشی های شهر گرگان بود که تولید بستنی و آب میوه دست ساز و سنتی داشتند (شامل ۲۵ بود). مقدار نمونه برای بستنی ۱۰۰ گرم و آب میوه (آب طالبی و آب هویج) ۱۰۰ سی سی بوده که در ظروف استریل برداشت شد. دستگاه ها و وسایل، طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ (آین نامه کاربرد روش های عمومی آزمایش های میکروبی) سترون گردید و کلیه مراحل آماده

تخمین زده می شود ۷۰ درصد بیماری های عفونی از طریق غذای ناسالم به انسان سرایت می کند و بیش از ۴۵۰ نوع بیماری ویروسی، انگلی، قارچی و باکتریایی از طریق غذا می توانند به انسان سرایت کند (۱). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، است که قادر به ساختن سم در ماده غذایی بوده و در شرایط هوایی، سم بیشتری تولید می کند. این میکرووارگانیسم در دمای پاستوریزاسیون به راحتی از بین می رود، ولی سم آن نسبت به این دما مقاوم است. در مقایسه با باکتری های دیگر، استافیلوکوکوس اورئوس در برابر خشکی مقاوم تر می باشد و آب فعال مورد نیاز اغلب باکتری ها ۰/۹۹ است، اما استافیلوکوکوس اورئوس تا فعالیت آبی ۰/۸۳ را تحمل نموده و برای تولید سم، به حداقل فعالیت آبی ۰/۸۴ احتیاج دارد. استافیلوکوکوس اورئوس قادر است در غلظت ۷/۵ تا ۱۵ درصد نمک رشد کند. غذاهایی که با دست تهیه می شوند و در شرایط غیر بهداشتی نگهداری می شوند، بیشتر در معرض آلودگی به استافیلوکوکوس هستند (۳). بستنی با توجه به مواد متشکله و pH نزدیک به خشی و نگهداری طولانی مدت، محیط مناسبی برای رشد میکرووارگانیسم ها محسوب می گردد. آلودگی بستنی در مراحل مختلف تولید رخ می دهد. در تولید صنعتی در مراحل پاستوریزاسیون، فریز کردن و سخت شدن به میکرووارگانیسم ها آلوده می گردد. اما در تولید سنتی به دلیل استفاده از شیرهای غیرپاستوریزه و عدم توجه به روند اعمال حرارت کافی بر روی مخلوط اولیه، آلودگی ظروف تهیه، نحوه توزیع و نگهداری، ظروف بسته بندی و بطور کلی عدم رعایت موازین بهداشت فردی و بهداشت محیطی در طول روند تولید، زمینه بروز آلودگی های میکروبی مختلف در این فرآورده را فراهم می آورد (۴). در کشور ما بدليل شرایط اقلیمی، میوه های متنوعی تولید و مصرف می گردد. با توجه به ذائقه و شرایط آب و هوایی، بسیاری از میوه ها بطور سنتی و به صورت آبمیوه به مقاضیان عرضه می گردد. با توجه به اینکه هنگام تهیه آبمیوه هیچگونه حرارتی به کار نمی رود و در صورت ایجاد شرایط نامناسب نگهداری و عدم رعایت اصول بهداشتی توسط عرضه کنندگان این محصول می تواند سلامت مصرف کنندگان را به مخاطره اندازد بنابراین بررسی بهداشتی

جدول ۱- ضوابط میکروبیولوژی و حدود مجاز آنها در بستنی و آب میوه

فرآورده	شمارش کلی میکروارگانیسم ها (CFU/g)	شمارش کلی فرم (CFU/g) ها	استافیلوکوکوس اورئوس (CFU/g)	استافیلوکوکوس سرئوس (CFU/g)	باسیلوس (CFU/g)	مخمرها (CFU/g)
بستنی	5×10^4	-	منفی	-	-	1×10^2
آب میوه	5×10^5	1×10^7	منفی	-	-	1×10^4

اورئوس، ۴۴ درصد نمونه ها به مخمر، ۲۸ درصد نمونه ها به باسیلوس سرئوس، ۱۶ درصد نمونه ها به استافیلوکوکوس کواگولاز منفی، ۱۲ درصد نمونه به لیستریا، ۸ درصد نمونه ها به باسیلوس سوپیلیتیس، ۴ درصد نمونه ها به باسیلوس لیکنی فورمیس و ۴ درصد نمونه ها به اکتینومایست ها آلدود بودند. همچنین بر اساس نتایج میزان آلدگی میکروبی در آب میوه های دست ساز (آب هویج و طالبی)، ۳۳/۳ درصد نمونه ها به مخمر، ۲۸/۵۷ درصد نمونه ها به باسیلوس سرئوس، ۱۴/۲۸ درصد نمونه ها به استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوپیلیتیس، ۴/۷۶ درصد نمونه ها به باسیلوس لیکنی فورمیس و لیستریا آلدود بودند.

بحث

یافته های حاصل از این بررسی و بررسی های مشابه در نقاط مختلف ایران و جهان بر بالا بودن میزان آلدگی میکروبی و انتقال آن به مصرف کنندگان می باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که اکثر بستنی های سنتی تولیدی شهر گرگان به علت عدم رعایت اصول بهداشتی آلدود به انواع میکروارگانیسم ها به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. نتایج این مطالعه با مطالعات انجام شده در ایران و جهان مطابقت دارد، از جمله مطالعه مختاریان و همکاران که در سال ۱۳۸۳ بر روی ۱۰۰ بستنی در شهر گناباد انجام شد نشان داد که ۶۷ درصد نمونه ها به استافیلوکوکوس اورئوس آلدود بودند.^(۶) مطالعه نعیم آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۷ که برروی بستنی های سنتی شهر بجنورد انجام شده بود نشان داد که ۸۰ درصد نمونه ها آلدود به استافیلوکوکوس اورئوس بوده اند.^(۵) مطالعه ای توسط Rossi و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ایتالیا در خصوص آلدگی میکروبی غذاهای گیاهی انجام شد، نشان داد که گونه های مختلف اورئوس، گونه های مختلف باسیلوس، مخمرها (زیگوساکارومیس) در غذاهای گیاهی

سازی و کشت نمونه، در مجاورت شعله انجام گرفت.^(۸) آماده سازی نمونه ها بر اساس روش های استاندارد تهیه شد.^(۹) کلیه آزمایش های صورت گرفته بر طبق دستورالعمل های مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران بر روی نمونه ها انجام گرفت. شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از رنگ آمیزی گرم، محیط کشت برد پارکر آگار، تست کاتالاز و کواگولاز انجام شد (شماره استاندارد ملی ایران ۶۸۰۶-۳)^(۱۰). جستجو و شناسایی گونه های مختلف باسیلوس، پس از کشت نمونه ها در محیط تریپتون سوی آگار (TSA)، بررسی مورفولوژی گلندی ها و انجام آزمایشات بیوشیمیایی اختصاصی صورت گرفت (شماره استاندارد ملی ایران ۱۷۱۶۳)^(۱۱). شناسایی لیستریا مونوستیوژن، پس از غنی سازی در سرما با استفاده از محیط کشت های آگار خوندار و لیستریا سلکتیو آگار انجام شد و جهت تأیید تشخیص گلندی های رشد کرده نیز تست های بیوشیمیایی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (شماره استاندارد ملی ایران ۴۵۲۴)^(۱۲). شناسایی مخمر با استفاده از محیط YGC آگار (Yeast extract Glucose Agar) و کورن میل آگار و مشاهده میکروسکوپی مشخص گردید^(۱۳، ۱۴). در تشخیص اکتینومایست ها از محیط کشت اختصاصی SCA (Starch Casein Agar) و مشاهده شکل و ظاهر گلندی و انجام رنگ آمیزی کاینیون استفاده گردید^(۱۵). تمامی محیط های کشت و مواد مصرفی در آزمون ها از شرکت مرک آلمان خریداری و استفاده شده است. ضوابط و حدود مجاز میکروبی بستنی و آب میوه طبق استاندارد موسسه تحقیقات صنعتی ایران در جدول ۱ نشان داده شده است.^(۱۶، ۱۷).

یافته ها

یافته ها نشان داد که میزان آلدگی میکروبی در مراکز تهیه بستنی سنتی ۵۶ درصد نمونه ها به استافیلوکوکوس

که در صد نمونه ها آلدوده به استافیلوکوکوس اورئوس بوده اند^(۵). مطالعه ای توسط ابراهیمیان و همکاران در سال ۱۳۸۴ در اهواز بر روی ۳۰ نمونه آب میوه انجام گرفت نشان داد که ۷۸ در صد نمونه های آب هویج و ۸۵ در صد نمونه های آب طالبی آلدوده به استافیلوکوک بوده اند^(۲۱). یافته های این پژوهش ها بیانگر میزان درصد بالاتر آلدودگی استافیلوکوکوس اورئوس در آب میوه ها نسبت به یافته های پژوهش حاضر است. یکی از دلایل آن آب و هوای منطقه می باشد که در اهواز به دلیل دمای بالاتر در تابستان میزان آلدودگی بالاتر و در بجنورد به دلیل عدم شرایط بهداشتی میزان آلدودگی بالاتر گزارش شده است. در حال حاضر به دلیل افزایش شرایط بهداشتی، افزایش آگاهی، نظارت بیشتر مراکز بهداشتی، عدم ذخیره و نگهداری آب میوه و گرفتن آن در حضور مشتری می تواند دلیل بر میزان آلدودگی کمتر در آب میوه های دست ساز در شهر گرگان باشد. از نقاط قوت این مطالعه بررسی گونه مختلف باکتری های گرم مثبت در آب میوه و بستنی و نمونه برداری از کلیه اماكن تهیه بستنی و آب میوه به صورت سرشماری می باشد. از نقاط ضعف مطالعه بررسی کمیکرووارگانیسم هاست.

نتیجه گیری

یافته های این بررسی نشان دهنده آلدودگی بالای بستنی های سنتی به استافیلوکوکوس اورئوس و میکرووارگانیسم های مختلف می باشد که نیاز به نظارت بیشتر مراکز بهداشتی، آموزش متقدیان در مورد اصول بهداشت فردی، بهداشت ساختمان و لوازم کار می باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان جهت تصویب طرح با کد ۹۲۰۷۰۲۹۰ و مساعدت انجام این طرح پژوهشی قدردانی می گردد.

وجود دارد. بیشترین آلدودگی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس و ریگوساکارومیس بایلی بوده است^(۱۸). مطالعه ای توسط Rho در سال ۲۰۰۶ در کره جنوبی بر روی شیرینی خامه ای کره ای انجام شد. نتایج نشان داد که میزان استافیلوکوکوس اورئوس در ماه های گرم بیشتر است^(۱۹). مطالعه رضایی و همکاران در سال ۱۳۹۰ که بر روی ۳۰ نمونه بستنی در شهر اراک انجام شده بود نشان داد که فقط ۱۶/۶۶ درصد نمونه ها آلدودگی کمتر از حد مجاز و ۸۳/۳۳ درصد نمونه ها میزان آلدودگی میکروبی بیش از حد مجاز داشتند^(۲۰). طبق استانداردها استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی و آب میوه به علت ایجاد مسمومیت غذایی نباید وجود داشته باشد. آلدودگی بالای بستنی ها به استافیلوکوکوس اورئوس بیانگر عدم رعایت بهداشت فردی، بهداشت ساختمان و ابزار و لوازم و همچنین نگهداری طولانی مدت بستنی می باشد. همچنین نتایج مطالعه نشان داد که آلدودگی میکروبی در آب میوه های دست ساز نیز وجود دارد اما میزان آلدودگی نسبت به بستنی های سنتی کمتر است و علت آن هم گرفتن آب میوه در حضور مشتری و وجود نظارت مراکز بهداشتی بر عدم نگهداری آب میوه ها می باشد و آلدودگی های مشاهده شده به دلیل آلدوده بودن ظروف و وسایل و عدم رعایت اصول بهداشتی توسط متقدی می باشد. طبق ضوابط بهداشتی وزارت بهداشت آب میوه دست ساز باید در حضور مشتری گرفته شده و عرضه شود. با توجه به این مطالعه مشخص شد برخی آب میوه ها دست ساز در یخچال نگهداری می شود و آلدودگی آنها نسبت به آب میوه های گرفته شده در حضور مشتری بیشتر است. نیاز به نظارت بیشتر سازمان های بهداشتی است. ولی بستنی های سنتی به دلیل تولید و ذخیره ممکن است آلدودگی بالاتری داشته باشند. مطالعه نعیم آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۷ که بر روی آب میوه های دست ساز در شهر بجنورد انجام شده بود نشان داد

References

1. Marandi A. *Health in the Islamic Republic of Iran*. 1999; 585.[Persian]
2. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. *Food-related illness and death in the United States*. Emerging Infectious Diseases. 1999; 5(5): 607-25. PMID:10511517.
3. Farajzadeh D. *Food Hygiene*. 3rd ed. 2008; 30-84.[Persian]
4. Shahryari A, Tabarsaa H, Ghasemi S, Shahinei A, Ghodes mofidi E. *Evaluation of Traditional Ice Cream Contamination to Escherichia coli and Enterobacteriaceae in Gorgan Ice Cream Enterprises in 2010*. Journal of Health. 2010; 1(2): 7-14.[Persian]
5. Naiemabadi A, Mirzaee R, Yazdani A, Armat MR, Betalbelui M, Yarahmadi M. *Microbial evaluation of traditional ice cream and homemade fruit juices and fruit juice sales in the confectionary trade units Bojnurd*. North Khorasan University of Medical Sciences Journal. 2009; 2(2,3): 45-50. [Persian]
6. Mokhtarian H, Shariatifar N, Mohamadzadeh M, Ghahramani M. *The survey on the bacterial contamination of traditional ice cream produced in Gonabad city*. Horizon Med Sci . 2009; 15(1) :45-51.[Persian]
7. Khezri M. *Evaluation of Microbial quality of 90 unpasteurized ice cream samples*. 18th National Congress of Food Technology. Mashhad. 2008.[Persian]
8. Institute of Standards and Industrial research of Iran. *Microbiology of food and animal feeding stuffs Guideline of general requirements for examination*. 1st ed. No: 9899. 2007.[Persian]
9. Institute of Standards and Industrial research of Iran. *Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 1: General rules for the preparation of initial suspension and decimal dilutions*. No 8923-1. 2007; 1st ed.[Persian]
10. Institute of Standards and Industrial research of Iran. *Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of positive staphylococci coagulase (staphylococcus aureus and other species)*. No 6806-3. 2006; 1st edition. [Persian]
11. Institute of Standards and Industrial research of Iran. *Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of presumptive Bacillus spp*. No 17163. 2014; 1st edition. [Persian]
12. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. *Standard of research method and detection of Listeria monocytogenes in milk and its products*. No 4524. 1999; 1st ed.[Persian]
13. Mathews S, Ngoma L, Gashe B, Mpuchane S. *General Microbiological Quality of Ice Cream and Ice Pop Sold in Gaborone, Botswana*. Ethno Med. 2013; 7(3): 217-226.
14. Salehian M, Salehifar E, Esfahanizadeh M, Karimzadeh L, Rezaei R, Molanejad M. *Microbial Contamination in Traditional Ice cream and Effective factors*. Mazand Uni Med Sci J. 2013; 23(99): 28-33. [Persian]
15. Mohseni M, Norouzi H. *Antifungal Activity of Actinomycetes Isolated from Sediments of the Caspian Sea*. J Mazand Univ Med Sci. 2013; 23(104): 80-87. [Persian]
16. Institute of Standards and Industrial research of Iran. *Microbiology of milk and milk products-Specifications*. No 2406. 2009; 2nt edition. [Persian].
17. Institute of Standards and Industrial research of Iran. *Soft drinks – Fruit juice and fruit juice products – Microbiological specification and test methods*. No 3414. 2007; 1st edition. [Persian]
18. Rossi F, Gaio E, Torriani S. *Staphylococcus aureus and Zygospachromyces bailii as primary microbial contaminants of a spoiled herbal food supplement and evaluation of their survival during shelf life*. Food Microbiology. 2010; 27(3): 356-362.
19. Rho MJ, Schaffner DW. *Microbial risk assessment of staphylococcal food poisoning in Korean kimbab*. International Journal of Food Microbiology. 2007; 116(3): 332-338.
20. Rezaei M, Ghasemi khah R, Parviz M, Zarei O. *Frequency of Bacterial Frequency of Bacterial Contamination in Traditional Ice Cream Produced in Arak, Iran (2011)*. mljgoums. 2014; 8(2): 88-92.
21. Ebrahimian S, Siavash M, Ghafari S. *Bacteriological study of traditional supply juice sales in Ahwaz City in the summer of 1384, manual Proceedings of the Ninth Conference of Environmental Health in Isfahan*; 2007.[Persian]

Sadeghi, M. (PhD)

Assistant Professor of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Environmental Health Research Center, Golstam University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Amini, A. (MSc)

MSc of Microbiology, Paramedical School, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Behnampour, N. (PhD)

Assistant Professor of Biostatistic School of health, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Arefian, A.

BSC Student of Environmental Health Engineering, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Abstract

Background and Objective: *Staphylococcus aureus* is an important cause of food poisoning. Due to the high consumption of fruit and ice cream in summer, this study aimed to determine the prevalence of *S. aureus* in traditional ice cream and juice in Gorgan, Iran.

Material and Methods: This cross-sectional study was conducted on 25 places selling traditional ice cream and juice in the summer of 2014 in Gorgan, Iran.

Results: Results showed that the microbial contaminants in traditional ice cream and juice centers were 56% and 14.28% of *S. aureus*, 44% and 33.3% of yeast, 28% and 28.57% of *B. cereus*, 12% and 4.76% of *Listeria*, 8% and 14.28% of *Bacillus subtilis* and 4% and 4.76% of *Bacillus licheniformis*, respectively.

Conclusion: The findings of this study indicated a high contamination of traditional ice cream and juice with *Staphylococcus aureus* and various microorganisms.

Keywords: Ice Cream, Food Contamination, *Staphylococcus Aureus*

Corresponding Author: Sadeghi, M.

Email: kargar@goums.ac.ir

Received: 9 Nov 2014

Revised: 3 Mar 2015

Accepted: 5 Apr 2015