

## MASTITİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN *CORYNEBACTERIUM* TÜRLERİ VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

H. Hüseyin Hadimli<sup>1</sup>® Osman Erganiş<sup>1</sup> Kürşat Kav<sup>1</sup> Zafer Sayın<sup>1</sup>

### *Corynebacterium* Species Isolated from Milk Samples of Dairy Cows with Mastitis and Antibiotic Susceptibilities

**Özet:** Bu çalışmada, süt ineklerinden izole edilen *Corynebacterium* türlerinin identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı. Yedi farklı işletmede bulunan 810 inek California Mastitis testi (CMT) ile tarandı ve CMT'inde pozitif sonuç veren 651 süt örneğinden 64 *Corynebacterium* spp. izole edildi. *Corynebacterium* izolatlarından 41'i (%64.06) *C. amycolatum*, 11'i (%17.18) *C. xerosis*, 7'si (%10.93) *C. minutissimum*, 3'ü (%4.68) *C. bovis* ve 2'si (%3.12) *C. pseudotuberculosis* olarak tanımlandı. *C. pseudotuberculosis* izolatları eritromisin ve lincomisine dirençli bulunurken, diğer *Corynebacterium* türlerinin (*C. amycolatum*, *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. bovis*) 18 farklı antimikrobiyal ajana değişik oranlarda duyarlı oldukları gözlemlendi.

**Anahtar Kelime:** *Corynebacterium amycolatum*, *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. bovis*, *C. pseudotuberculosis*, bovine mastitis

**Summary:** In this study, identification of *Corynebacterium* spp. isolated from dairy cows and detection of their antibiotic susceptibility were aimed. A total of 810 cattle from 7 dairy herd has been monitored by CMT, from a number of 651 samples detected positive by CMT and 64 *Corynebacterium* spp. were isolated. Of *Corynebacterium* isolates, 41 (64.06%) were identified as *C. amycolatum*, 11 (17.18%) *C. xerosis*, 7 (10.93%) *C. minutissimum*, 3 (4.68%) *C. bovis* and 2 (3.12%) *C. pseudotuberculosis*. While *C. pseudotuberculosis* isolates were found to resistant to erythromycin and lincomycin, other *Corynebacterium* species (*C. amycolatum*, *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. bovis*) were differently susceptible to 18 antibacterials agents.

**Key Words:** *Corynebacterium amycolatum*, *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. bovis*, *C. pseudotuberculosis*, bovine mastitis

### Giriş

Düzensiz şekilleri nedeniyle korinebakteri olarak isimlendirilen Gram pozitif ve sporsuz bakteriler ineklerin meme bezlerinden izole edilmiştir (Brooks ve Barnum 1984b, Oliver ve Juneja 1990, Watts ve ark 2000). *Corynebacterium* cinsi içinde klinik açıdan önemli birçok tür bulunmaktadır. Veteriner klinik mikrobiyolojide, korinebakterilerin patojenik potansiyelleri fazla dikkate alınmamış ve bu nedenle, belli başlı türler dışında izolatların identifikasyonu yapılmamıştır (Huxley ve ark 2003). Subklinik mastitislerde stafilokoklar en önemli etiyolojik ajan olarak değerlendirilmesine rağmen korinebakterilerin izole edildiği belirtilmiştir (Ulusoy ve ark 1985, Nizamioğlu ve ark, 1989, Ateş ve ark 1991). Mastitis

olgularından en fazla izole edilen türler; *C. bovis*, *C. pseudotuberculosis* ve *Arcanobacterium pyogenes* (önceki isimleri; *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes*) olarak belirtilmiş, diğer türlerin ise klasik metotlarla tanımlanmadığı ileri sürülmüştür (Watts ve Rossbach 2000, Watts ve ark 2000).

Korinebakteri türleri lipofilik ve nonlipofilik olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Klinik ve subklinik mastitislerden 4 tür nonlipofilik korinebakteriler izole edilmiş ve bu türler; *C. amycolatum*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* ve *C. minutissimum* olarak belirlenmiştir. Bu türler arasında en fazla izole edilen nonlipofilik korinebakteri türünün *C. amycolatum* olduğu açıklanmıştır (Hommez ve ark 1999, Watts

ve ark 2000). *C. amycolatum* ve *C. minutissimum* daha çok insanlardaki hastalık olgularından izole edilmiş ve *C. xerosis* veya *C. striatum* şeklinde yanlış tanıya edilmiştir (Wauters ve ark 1998).

İnek mastitislerine neden olan lipofilik *Corynebacterium* türleri arasında en fazla izole edilen *Corynebacterium bovis* olmuştur (Brooks ve Barnum 1984b, Oliver ve Juneja 1990, Watts ve ark 2000). Koyun mastitislerinde ise *C. mastitidis* (Fernandez-Garayzabal ve ark 1997) ve *C. camporealis* (Fernandez-Garayzabal ve ark 1998) türleri izole edilmiştir. *C. bovis*'in meme bezinde bulunmasının patolojik bir durumdan ziyade, diğer mikroorganizmalardan ileri gelen meme içi enfeksiyonlarına karşı koruyucu bir durum olduğu belirtilmiştir (Huxley ve ark 2003) ve meme hijyeni açısından, *C. bovis*'in, meme kanalına kolonize olmasının, bir indikatör olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda (Brooks ve Barnum 1984a, Pankey ve ark 1985), *C. bovis* ile enfekte meme bezinde *Staphylococcus aureus*'a karşı dirençliliğin arttığı, ancak, *Streptococcus agalactiae* enfeksiyonuna karşı duyarlılığın yaklaşık 8.5 kez arttığı belirtilmiştir.

Son yıllardaki çalışmalar (Watts ve Rossbach 2000, Garcia-Crespo ve ark 2005), *C. bovis*'in meme bezini enfekte etme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. *C. bovis* ile meme bezinin enfekte olması, meme bezinin sekretorik hücre fonksiyonunu, süt verimini ve somatik hücre sayılarını etkilediği bildirilmiş olmasına rağmen (Oliver ve Juneja 1990), *C. bovis*'in minor bir patojen olarak dikkate alınabileceği ileri sürülmüştür (Watts ve ark 2000, Garcia-Crespo ve ark 2005).

Bu çalışmada, California Mastitis Testi (CMT) ile pozitif saptanan inek meme loblarından alınan süt örneklerinde *Corynebacterium spp.* türlerinin izole ve tanıya edilmesi ve bu türlerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

### Materyal ve Metot

Konya, Kayseri ve Afyon bölgesinde toplam 7 entegre işletmede bulunan 810 inek CMT (Schalm ve ark 1971) ile incelenerek CMT'inde pozitif sonuç veren 651 süt örneği toplandı.

CMT pozitif meme loblarından, meme başları % 70'lik etil alkolü pamukla silindikten ve ilk süt atıldıktan sonra steril tüplere 10 ml süt örneği alındı ve mikrobiyolojik yoklamalar için en kısa süre ve soğuk zincir içerisinde Selçuk Üniversitesi Ve-

teriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı.

Süt örnekleri % 5 koyun kanı içeren kanlı agar ekildi ve aerobik ortamda 37°C'de 24-72 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden, Gram pozitif, katalaz pozitif, sporsuz ve düzensiz basil şeklindeki mikroorganizmalar *Corynebacterium spp.* yönünden değerlendirildiler. Şüpheli izolatlar; sıvı besiyerinde bulanıklık, +20°C'de üreme, +42°C'de glikoz fermentasyonu, üre, glikoz, nitrat reduksiyonu, eskülin, fruktoz, mannoz, galaktoz, sakkaroz, trehaloz, maltoz, riboz, alkalın fosfat, nisaşta indirgeme gibi biyokimyasal özelliklerine göre tanıya edildi (Wauters ve ark 1998, Hommez ve ark 1999, Watts ve ark 2000).

*Corynebacterium* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri; oksitetrasiklin (30 µg; Oxoid, UK), marbofloksasin (5 µg; Vetoquinol S. A., France), sulbaktam+ampisilin (30 µg; Oxoid, UK), basitrasin (10 U; Oxoid, UK), ofloksasin (5 µg; Oxoid, UK), enrofloksasin (5 µg; Oxoid, UK), cefaperazon (75 µg; Bioanalyse, UK), penisilin G (10 U; Oxoid, UK), neomisin (30 µg; Oxoid, UK), amoksisilin+klavulanik asit (30 µg; Oxoid, UK), eritromisin (15 µg; Oxoid, UK), gentamisin (10 µg; Oxoid, UK), kloksasilin (5 µg; Oxoid, UK), ampisilin (25 µg; Oxoid, UK), linkomisin (10 µg; Oxoid, UK), trimetoprim+sulfametaksazol (25 µg; Oxoid, UK), danofloksasin (5 µg; Pfizer), amoksisilin (25 µg; Oxoid, UK) disk difüzyon yöntemi ile %5 koyun kanı katılmış Mueller-Hinton agarda (Oxoid) yapıldı (Bauer ve ark 1966). Besiyerleri 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi.

### Bulgular

İşletmelere göre *Corynebacterium spp.*'lerin izolasyon dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. *Corynebacterium spp.*'lerin izolasyonları işletme bazında ele alındığında; *C. amycolatum* 7 işletmenin hepsinde, *C. xerosis* 4'ünde, *C. minutissimum* 3'ünde, *C. bovis* 2'sinde ve *C. pseudotuberculosis* 1'inde izole edilmiştir. Toplam 64 adet izolatın 41'i (%64.06) *C. amycolatum*, 11'i (%17.18) *C. xerosis*, 7'si (%10.93) *C. minutissimum*, 3'ü (%4.68) *C. bovis* ve 2'si (%3.12) *C. pseudotuberculosis* olarak tanıya edilmiştir.

*Corynebacterium* izolatlarının 18 farklı antimikrobiyal ajana karşı duyarlılıkları Tablo 2'de verilmiştir. Tüm *Corynebacterium* türleri; marbofloksasin, sulbaktam+ampisilin, basitrasin, ofloksasin, enrofloksasin, neomisin, amok-

sisilin+klavulanik asit, danofloksasin ve amoksisilin'e karşı duyarlı (%100) oldukları belirlendi. Ayrıca, cefaperazon ve penisiline %98.43, ampisiline %96.88, kloksasilin %95.32, gentamisine %92.19, eritromisine %64.07, trimetoprim+sulfametaksazol ve linkomisine %60.94 oranlarında duyarlı oldukları gözlemlendi.

Bununla birlikte, *Corynebacterium* türleri ayrı olarak değerlendirildiğinde; *C. xerosis* ve *C. bovis* izolatları trimetoprim+sulfametaksazola %63.63 ve %66.63; *C. minutissimum* izolatları eritromisine %57.14 oranlarında ve *C. pseudotuberculosis* izolatları; eritromisin ve linkomisine bütünüyle (%100) dirençli bulundu.

### Tartışma ve Sonuç

İneklerin meme bezlerinden izole edilen korinebakterilerin identifikasyonu çoğunlukla Gram boyama, koloni morfolojisi, hemoliz ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılmaktadır (Brooks ve Barnum 1984b). Örneklerin 48 saatlik inkübasyonundan sonra küçük, β-hemolitik koloniler çoğunlukla *A. pyogenes* (*C. pyogenes*, *A. pyogenes*) olarak değerlendirilmektedir (Hommeze ve ark 1999). *C. bovis* identifikasyonu ise, % 5 koyun kanlı agarda 48 saat inkübasyon sonrası çoğunlukla küçük beyaz hemolizsiz kolonilerin varlığına dayanmaktadır (Watts ve ark 2000).

İnek mastitislerinden *C. amycolatum* ve *C. minutissimum* izole edilmiştir (Watts ve ark 2000). Ayrıca, *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* türleri de hayvanlardaki mastitis olgularıyla ilgili bulunmuştur (Hommeze ve ark 1999). Keçilerin subklinik mastitislerinden *C. bovis* ve *C. ulcerans* izolasyonları bildirilmiştir (Wakwoya ve ark 2006). İsrail'de, bir sürüde 32 inek ve düvede *C. pse-*

*dotuberculosis* teşhis edilmiş, ineklerin %25'inin süt örneklerinden etken izolasyonu yapıldığı rapor edilmiştir (Yeruham ve ark 2004). Ülkemizde, mastitis üzerine yapılan çalışmalarda *C. bovis* ve *A. pyogenes* haricinde diğer türlerle ilgili bilgiler verilmemiştir (Arda ve İstanbulluoğlu 1980, Ulusoy ve ark 1985, Nizamlıoğlu ve ark 1989, Ateş ve ark 1991, Hadimli ve Uçar 1999). Bu çalışmada, 64 *Corynebacterium* izolatları arasında en yaygın tür örnekleme yapılan tüm işletmelerden izole edilen *C. amycolatum* olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, sadece 1 işletmede *C. pseudotuberculosis*, ve 2 işletmede *C. bovis* izole edilmiştir.

Mastitislerden izole edilen bakterilerin antibakteriyel duyarlılık bilgileri daha çok *S. aureus*, *Streptococcus spp.* ve koliformlarla ilgilidir (Kaya ve ark 1993, Hadimli ve Uçar 1999). *Corynebacterium spp.* ve *A. pyogenes* türleri de önemli etkenleri olmasına rağmen korinebakteri türlerinin ve antimikrobiyal maddelere duyarlılıkları konusunda bilgiler sınırlıdır (Watts ve Rossbach 2000, Fernandez ve ark 2001). Bu çalışmada, izole edilen *Corynebacterium* türlerin marbofloksasin, sulbaktam+ampisilin, basitrasin, ofloksasin, enrofloksasin, neomisin, amoksisilin+klavulanik asit, danofloksasin, amoksisilin, cefaperazon, penisilin, kloksasilin, ampisilin ve gentamisine duyarlılıklarının oldukça yüksek olduğu belirlendi. İzole edilen korinebakterilerin; oksitetrasiklin, eritromisin, trimetoprim+ sulfametaksazol ve linkomisine duyarlılıkları nispeten az ya da dirençli olarak tespit edildi. Özellikle, *C. xerosis* ve *C. bovis* izolatlarının trimetoprim+ sulfametaksazola %63.63 ve %66.66, *C. minutissimum* izolatlarının eritromisine %57.14 ve *C. pseudotuberculosis* izolatlarının eritromisin ve linkomisine dirençli (%100) oldukları saptandı.

Sonuç olarak, ineklerin süt örneklerinden farklı oranlarda izole ve 5 farklı (*C. amycolatum*, *C. xe-*

Tablo 1. İşletmelere göre *Corynebacterium* türlerinin dağılımı

İşletme No	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. xerosis</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>
1	13	3	2	-	-
2	6	6	-	2	-
3	3	1	3	-	-
4	13	1	2	1	2
5	2	-	-	-	-
6	1	-	-	-	-
7	3	-	-	-	-
Toplam	41	11	7	3	2

Tablo 2. *Corynebacterium* türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları

Antibiyotik	C.amycolatum (n=41)		C.xerosis (n=11)		C.minutissimum (n=7)		C.bovis (n=3)		C.pseudotuberculosis (n=2)		Toplam (n=64)			
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	%	S	%
Oksitetrasiklin	9	32	2	9	2	5	-	3	-	2	13	20.31	51	79.69
Marbofloksasin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100
Sulbaktam+														
Ampisilin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100
Basitrasin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100
Ofloksasin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100
Enrofloksasin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100
Cefaperazon	-	41	-	11	-	7	1	2	-	2	1	1.57	63	98.43
Penisilin	1	40	-	11	-	7	-	3	-	2	1	1.57	63	98.43
Neomisin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100
Amoksisilin+														
Klavulanik asit	-	41	-	11	-	7	-	2	-	2	-	-	64	100
Eritromisin	13	28	4	7	4	3	-	3	2	-	23	35.93	41	64.07
Gentamisin	3	38	1	10	1	6	-	3	-	2	5	7.81	59	92.19
Kloksasilin	1	40	-	11	1	6	1	2	-	2	3	4.68	61	95.32
Ampisilin	1	40	1	10	-	7	-	3	-	2	2	3.12	62	96.88
Linkomisin	16	25	5	6	2	5	-	3	2	-	25	39.06	39	60.94
Trimethoprim+														
Sulfametaksazol	14	27	7	4	2	5	2	1	-	2	25	39.06	39	60.94
Danofloksasin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100
Amoksisilin	-	41	-	11	-	7	-	3	-	2	-	-	64	100

R= Dirençli, S=Duyarlı

*rosis*, *C. minutissimum*, *C. bovis* ve *C. pseudotuberculosis*) türde identifiye edilmesi, *A. pyogenes* ve *C. bovis* dışında diğer *Corynebacterium* türlerinin de mastitis etkenleri olarak dikkate alınması gerektiğini göstermiştir. Ayrıca, izole edilen korinebakteri türlerinin antimikrobiyal maddelere karşı oldukça duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Biyokimyasal özelliklerine göre korinebakteri türlerinin identifikasyonunda yanılmalara sebep olmamak için, izolatların moleküler tiplendirmelerinin de yapılmasında yarar olabileceği kanaatine varılmıştır.

## Kaynaklar

- Arda, M., İstanbulluoğlu, E. (1980) Mastitislere neden olan aerobik, mikroaerofilik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonları üzerinde çalışmalar. Doğa Bilim Derg., Vet. Hay./ Tar. Orm., ; 125-130.
- Ateş, M., Erganiş, O., Çorlu, M., Serpek, B. (1991) Konya yöresindeki mastitisli ineklerden elde edilen sütlerin mikrobiyel florası ve LDH aktivitesi üzerinde çalışmalar. Türk. J. Vet. Aminal Sci., 16; 19-30.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 45:493.

- Brooks, B. W., Barnum, D. A. (1984a) The susceptibility of bovine udder quarters colonized with *Corynebacterium bovis* to experimental infection with *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus agalactiae*. *Can J Comp Med.*, 48; 146-150.
- Brooks, B. W., Barnum, D. A. (1984b) Characterization of strains of *Corynebacterium bovis*. *Can J. Comp. Med.*, 48; 230-232.
- Fernandez, E. P., Vela, A. I., Las Heras, A., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J. F., Moreno, M. A. (2001) Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis. *Int. J. Antimicrobial Agent.*, 18; 571-574.
- Fernandez-Garayzabal, J. F., Collins, M. D., Hutson, R. A., Fernandez, E. P., Monasrerio, R., Marco, J., Dominguez, L. (1997) *Corynebacterium mastitidis* sp. nov., isolated from milk of sheep with subclinical mastitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47; 1082-1085.
- Fernandez-Garayzabal, J. F., Collins, M. D., Hutson, R. A., Gonzalez, I., Fernandez, E. P., Dominguez, L. (1998) *Corynebacterium camporealensis* sp. nov., associated with subclinical mastitis in sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48; 463-468.
- Garcia-Crespo, D., Navas, J., Gradillas, G., Juste, R. A. (2005) Technical Note: Molecular typing of *Corynebacterium bovis* isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 88; 1705-1707.
- Hadimli, H. H. ve Uçar, M. (1999) Klinik ve subklinik mastitislerin sağıtımında amoksisilin+klavulanik asit (Synulox L.C.)'in Etkinliği. *Hayv. Araşt. Derg.*, 9; 65-70.
- Hommeze, J., Devriese, L. A., Vanechoutte, M., Riegel, P., Butaye, P., Haesebrouck, F. (1999) Identification of nonlipophilic *Corynebacteria* isolated from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, 37; 954-957.
- Huxley, J. N., Gren, M. J., Bradley, A. J. (2003) *Corynebacterium bovis*-Friend or Foe? Proceedings of the British Mastitis Conference, Garstang, p 23-34.
- Kaya, O., Erganiş, O., Kuyucuoğlu, Y. (1993) İnek mastitislerine sebep olan mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *Türk Vet. Hek. Derg.*, 5; 49-50.
- Nizamlioğlu, M., Tekeli, T., Erganiş, O., Başpınar, N. (1989) İneklerde subklinik mastitislerin biyokimyasal ve mikrobiyolojik yönden incelenmesi. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 5; 135-143.
- Oliver, S. P., Juneja, V. K. (1990) Growth of *Corynebacterium bovis* in mammary secretions during the physiological transitions of bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 73; 351-356.
- Pankey, J. W., Nickerson, S. C., Boddie, R. L., Hogan, J.S. (1985) Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.*, 68;2684-2693.
- Schalm, O. W., Carroll, E. J., Jain, N. C. (1971) Bovine mastitis. Lea and Febiger Co, Philadelphia.
- Ulusoy, E., İzgür, M., Akay, Ö., Diker, K. S., Aydın, N., Arda, M. (1985) Mastitisli inek sütlerinden izole edilen mikroorganizmaların identifikasyonları ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerinde bir araştırma. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 32; 358-370.
- Wakwoya, A., Molla, B., Belihu, K., Kleer, J., Hildebrandt, G. (2006) A cross-sectional study on the prevalence, antimicrobial susceptibility patterns, and associated bacterial pathogens of goat mastitis. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 4; 169-176.
- Watts, J. L., Lowery, D. E., Teel, J. F., Rossbach, S. (2000) Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.*, 83; 2373-2379.
- Watts, J. L., Rossbach, S. (2000) Susceptibilities of *Corynebacterium bovis* and *Corynebacterium amycolatum* isolates from bovine mammary glands to 15 Antimicrobial agents, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44; 3476-3477.
- Wauters, G., Van Bosterhaut, B., Janssens, M., Verhaegen, J. (1998) Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative *Corynebacteria* of human origin. *J. Clin. Microbiol.*, 36; 1430-1432.
- Yeruham, I., Friedman, S., Perl, S., Elad, D., Berkovich, Y., Kalgard Y. (2004) A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. *Vet. Dermatol.*, 15; 315-319.