

2014-2024 Yılları Arasında İzole Edilen Salmonella Türlerinin Antibiyotiklere Direnç Profilleri

Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI ¹, İlknur BIYIK ¹, Canberk ÇINAR ¹,
Mahmoud YOSER ¹, Asuman BİRİNCİ ¹

ÖZ

Amaç: *Salmonella* türlerinin barsak enfeksiyonlarına yol açması ve direnç oranlarındaki ciddi artışlar; antibiyotik direncinin izlenmesini anlamlı hale getirmiştir. *Salmonella* suşlarının yayılmasını daha iyi izlemek ve kontrol etmek için, ilaç direncinden sorumlu mekanizmaları bilmek ve diğer *Salmonella* suşlarına nasıl aktarıldığını anlamak oldukça önemlidir. Bölgemizdeki *Salmonella* izolatlarının sıklığını, yıllara göre antibiyotik direnç değişim oranlarını ve ampirik tedavi seçeneklerini araştırmak amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında Ocak 2014-Ocak 2024 tarihleri arasında farklı klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* türleri çalışmaya dahil edilmiştir. Farklı klinik örneklerden biri olan gaita örnekleri *Salmonella-Shigella* agar ve Eozin-Metilen-Blue agara ekilmiştir. Diğer örnekler ise kanlı agar ve Eozin-Metilen-Blue agara ekim yapılmıştır. Bu örnekler, 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesinde The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing kriterleri kullanılmıştır.

Bulgular: *Salmonella* türleri 589 örnekten izole edilmiştir. Gaita örneğinden izole edilen 444 *Salmonella* suşunun ampisilin, siprofloksasin, trimetoprim/sulfametoksazole direnç oranlarının sırasıyla %14,63, %12,61, %4,72 olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz *Salmonella* spp.'nin 2014-2024 yılları arasında izole edilme oranlarının sırasıyla; %3,40, %6,62, %6,79, %6,96, %7,30, %8,49, %13,07, %9,68, %6,96, %28,86, %1,87 olduğu bulunmuştur.

Sonuç: Salmonelloz şüphesi olan olguların tedavisinde ampirik antimikrobik ilaçların doğru seçimi için direnç patenlerinin izlenmesi gereklidir. Çalışmamız epidemiyolojik verilerin belirlenmesi ve bu konuda yapılacak yeni çalışmalara katkıda bulunması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci; gaita; *salmonella*.

Antibiotic Resistance Profiles of Salmonella Species Isolated between 2014-2024

ABSTRACT

Aim: The fact that *Salmonella* species cause intestinal infections and the significant increases in resistance rates have made it meaningful to monitor antibiotic resistance. In order to better monitor and control the spread of *Salmonella* strains, it is crucial to know the mechanisms responsible for drug resistance and understand how it is transmitted to other *Salmonella* strains. We aimed to investigate the frequency of *Salmonella* isolates in our region, the rates of antibiotic resistance change over the years and empirical treatment options.

Material and Methods: *Salmonella* species isolated from different clinical samples in Medical Microbiology laboratory between January 2014 and January 2024 were included in the study. One of the different clinical samples, stool samples, was inoculated on *Salmonella-Shigella* agar and Eosin-Methylene-Blue agar. Other samples were inoculated on blood agar and Eosin-Methylene-Blue agar. These samples were incubated at 37°C for 24 hours and then evaluated. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing criteria were used.

Results: *Salmonella* species were isolated from 589 samples. The resistance rates of 444 *Salmonella* strains isolated from stool samples to ampicillin, ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole were 14.63%, 12.61%, 4.72%, respectively. The isolation rates of *Salmonella* spp. between 2014 and 2024 were 3.40%, 6.62%, 6.79%, 6.96%, 7.30%, 8.49%, 13.07%, 9.68%, 6.96%, 28.86%, 1.87%, respectively.

Conclusion: Monitoring of resistance patterns is necessary for the correct selection of empirical antimicrobial drugs in the treatment of cases with suspected salmonellosis. Our study is important in terms of determining epidemiologic data and contributing to new studies on this subject.

Keywords: Antibiotic resistance; feces; *salmonella*.

GİRİŞ

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella* türleri Gram negatif basillerdir. Dünya üzerindeki morbidite ve mortalitenin önemli bir sebebidir. Dünyada ortalama olarak her yıl 2,5-3 milyar ishal vakasından sorumludur. *Salmonella*'nın bulaşması sıklıkla hayvansal kökenli gıdaların ve kontamine suların tüketimiyle ilişkilidir (1). *Salmonella* ilk kez 1884 yılında Amerikalı bakteriyolog Daniel Elmer Salmon tarafından bir hayvan bağırsağından izole edilmiştir. Salmonelloz vakalarının %80 kadarı bilinen bir salgının parçası olarak tanınmamakta ve sporadik vakalar olarak kabul edilmektedir (2). *Salmonella bongori* ve *Salmonella enterica* olarak iki taksonomik aileye ayrılan *Salmonella* türleri, somatik (O) antijenine göre farklı serogrupları, virulans (Vi) ve flajellar (H) antijenlerine göre çeşitli serotipleri tanımlanmıştır. *S. enterica* kendi içindeki serotiplere göre farklı klinik tablolara neden olmaktadır. Bu klinik tabloların en önemlileri; bakteriyemi, enterik ateş (tifo), lokalize organ enfeksiyonları ve asemptomatik taşıyıcılıktır (3). Özellikle enterik ateş kanalizasyon alt yapısının yetersiz olduğu yerlerde sık görülür. Gelişmiş ülkelerde görülen enterik ateş olgularının çoğu ise endemik bölgelere seyahat ile meydana gelmektedir (4). Son yıllarda tüm dünyada *Salmonella* türlerinde antimikrobiyal direnç oranlarının arttığı bildirilmektedir. Birinci basamak tedavide kullanılan; ampicilin (AMP), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) kloramfenikol gibi antimikrobiyallerin yanı sıra, seftriaksona ve kinolonlara da direnç bildirilmiştir. Antibiyotik direncini takip etmek; antibiyotik kullanımının gerekli olduğu durumlarda ampirik tedavi seçeneklerini belirlemek açısından oldukça önemlidir (5). Çoklu ilaca dirençli (ÇİD) *Salmonella* suşlarının yayılmasını daha iyi izlemek ve kontrol etmek için, ilaç direncinden sorumlu mekanizmaları bilmek ve diğer *Salmonella* suşlarına nasıl aktarıldığını anlamak oldukça önemlidir (3). Bu çalışmada 2014-2024 yılları arasında laboratuvarımıza gelen klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* izolatlarının yıllara göre antimikrobiyal direnç oranlarının belirlenerek ampirik tedavi seçeneklerine katkıda bulunması ve bölgemizdeki direnç oranlarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (Tarih: 25/08/2022, Sayı: 392 karar no ile) onay alınmıştır. Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına Ocak 2014-Ocak 2024 yılları arasında gelen dışkı, kan, idrar ve apse/yara yeri kültürlerinde üreyen *Salmonella* izolatları değerlendirmeye alınmıştır. Gaita örnekleri *Salmonella-Shigella* (SS) agar ve Eozin-Metilen Blue (EMB) agar (Becton Dickinson, ABD) besiyerine, diğer örnekler kanlı agar (Becton Dickinson, ABD) ve EMB agar besiyerine ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan örnekler, 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Bakteri türlerinin tanımlanmasında Vitek MS (BioMérieux, Fransa) ve bakterilerin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde Vitek2 (BioMérieux, Fransa) compact otomatize sistemleri kullanılmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesinde ilgili döneme ait

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterleri kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 589 izolatın %68,93 'ü (406) *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) %30,90 'ı (182), *Salmonella*.spp. %0,17'si (1) *S. paratyphi* A olarak tanımlanmıştır. Hastaların %57,89'u (341) erkek, %42,11'i (248) kadındır. *Salmonella* türlerinin %75,38'i (444) dışkı örneklerinde, %9,51'i (56) kan örneklerinde, %7,64' ü (45) steril vücut sıvısı örneklerinde, %7,47'si (44) idrar örneklerinden izole edilmiştir. İzole edilen örneklerin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. İzole edilen örneklerin en çok gönderildiği servis pediatri olmuştur ve servislerin dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen *Salmonella* serotiplerinin antimikrobiyal duyarlılıkları Tablo 3'te yer almaktadır. Buna göre tüm *Salmonella* türlerinin %14,09'u (83) AMP, %15,78'i (93) siprofloksasine (CİP), %4,07'si (24) SXT dirençli bulunmuştur. *S. enteritidis* izolatlarının %11,57'si (47) AMP dirençli, %16,25'i (66) CİP dirençli %3,44'ü (14) SXT'ye dirençli bulunmuştur. *Salmonella* spp. izolatlarının ise %19,23'ü (35) AMP dirençli, %14,83'ü (27) CİP dirençli, %5,49'sı (10) SXT dirençli bulunmuştur. Tek olarak izole edilen *S. paratyphi* A ise sadece AMP dirençli olarak bulunmuştur. *Salmonella* izolatlarının yıllara göre farklı antibiyotiklere direnç profili Tablo 4'te gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların 41 tanesinde seftriakson, seftazidim ve sefepim antibiyotiklerinin duyarlılıkları araştırılmış olup tamamı duyarlı bulunmuştur. Duyarlı bulunan bu izolatların dokuz tanesinde (%41) rutin olarak test edilen antibiyotiklerden CİP dirençli bulunmuştur, bir tanesinde (%2,4) CİP ve SXT dirençli bulunmuştur, yedi tanesinde (%17) ise AMP ve CİP dirençli olarak bulunmuştur. Seftriakson ve seftazidim dirençli bir izolat ise sadece SXT duyarlı olarak bulunmuştur. Beş izolatta ise kloramfenikol duyarlılığı araştırılmış ve tüm izolatlar kloramfenikole duyarlı bulunmuştur. Bu izolatlardan bir tanesi AMP dirençli olarak bulunmuştur.

Tablo 1. İzole edilen örneklerin dağılımı

Örnek Tipi	Sayı (%)
Dışkı	444 (75,38)
Kan	56 (9,51)
Diğer (Steril Vücut Sıvıları)	45 (7,64)
İdrar	44 (7,47)

Tablo 2. Örneklerin gönderildiği servislerin dağılımı

Örneklerin Gönderildiği Servisler	Sayı (%)
Pediatri	253 (43)
Dahiliye	112 (19)
Enfeksiyon hastalıkları	82 (14)
Acil	72 (12)
Diğer	46 (8)
Cerrahi	24 (4)

Tablo 3. *Salmonella* izolatlarının antibiyotik direnç oranları

	<i>S. enteritidis</i> (n=406)	<i>Salmonella</i> spp. (n=182)	<i>S. paratyphi A</i> (n=1)	Toplam (n=589)
Antibiyotik direnci	% (sayı)	% (sayı)	% (sayı)	% (sayı)
AMP	11,57 (47)	19,23 (35)	100 (1)	14,09 (83)
CİP	16,25 (66)	14,83 (27)	0 (0)	15,78 (93)
SXT	3,44 (14)	5,49 (10)	0 (0)	4,07 (24)

Ampisilin (AMP), Siprofloksasin (CİP), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT)

Tablo 4. *Salmonella* izolatlarının yıllara göre farklı antibiyotiklere direnç oranları

Direnç paterni	Tek antibiyotiğe direnç	İkili direnç	Üçlü direnç
Yıllar (İzole edilen <i>Salmonella</i> sayıları)			
2014 (20)	4 (4 AMP)	-	-
2015 (39)	24 (17 AMP, 1 CİP, 6 SXT)	4 (1 AMP-CİP, 3 AMP-SXT)	-
2016 (40)	18 (8 AMP, 7 CİP, 3 SXT)	2 (2 CİP-SXT)	-
2017 (41)	15 (7 AMP, 5 CİP, 3 SXT)	4 (1 AMP-CİP, 1 AMP-SXT, 2 CİP-SXT)	-
2018 (43)	8 (7 AMP, 6 CİP)	3 (3 AMP-CİP)	-
2019 (50)	18 (5 AMP, 11 CİP, 2 SXT)	5 (4 AMP-CİP, 1 AMP-SXT, 1 CİP-SXT)	-
2020 (77)	31 (12 AMP, 16 CİP, 3 SXT)	13 (10 AMP-CİP, 3 CİP-SXT)	-
2021 (57)	34 (16 AMP, 15 CİP, 3 SXT)	26 (11 AMP-CİP)	2 (2 AMP-CİP-SXT)
2022 (41)	17 (3 AMP, 11 CİP, 3 SXT)	1 (1 AMP-CİP)	-
2023 (170)	29 (4 AMP, 21 CİP, 4 SXT)	3 (1 AMP-SXT, 2 CİP-SXT)	1 (1 AMP-CİP-SXT)
2024 (11)	-	-	-

Ampisilin (AMP), Siprofloksasin (CİP), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT)

TARTIŞMA

Salmonella spp.'nin çeşitli antibiyotiklere karşı direnci *Salmonella* enfeksiyonunun tedavisini zorlaştırmaktadır (6). 1960' ların başında *Salmonella*'nın tek bir antibiyotiğe; kloramfenikole karşı direnci ilk kez rapor edildi. O tarihten bu yana, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), İngiltere ve Suudi Arabistan da dahil olmak üzere birçok ülkede bir veya daha fazla antimikrobiyale karşı direnç bildirilmiştir (7). AMP, kloramfenikol ve SXT gibi antimikrobiyal ajanlar *Salmonella* enfeksiyonları için geleneksel tedaviler olarak kullanılır. Geleneksel antibiyotiklere karşı direncin ortaya çıkmasıyla birlikte, florokinolonlar ve geniş spektrumlu sefalosporinler çoklu ilaca dirençli *Salmonella* tedavisinde tercih edilen antimikrobiyal ajanlar olarak ortaya çıkmıştır (8). Antibiyotik direnç genleri bakteriler arasında çok kolay bir şekilde aktarılabilirdiği için çoklu ilaca dirençli suşlar hızla artmaktadır (9). Günümüzde 3. ve 4. kuşak sefalosporinler ve kinolonlar gibi klinik açıdan önemli antimikrobiyallere karşı direncin ortaya çıkmasıyla tablo daha da ağırlaşmaktadır (10). Dirençli *Salmonella* türlerinin ortaya çıkması, insanlarda ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların şiddetinin artmasına da neden olmuştur. Epidemiyolojik çalışmalar, dirençli *Salmonella* suşlarının duyarlı suşlardan daha şiddetli veya uzun süreli sendromlara neden olduğunu göstermektedir, bu da dirençli suşlarının duyarlı olanlardan daha virülen olduğu anlamına gelir (11). *Salmonella* cinsinde antimikrobiyal direnç üzerine gerek ülkemizde gerekse dünyada çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde *Salmonella*

türlerinin antibiyotiklere olan duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmalarda, çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde birinci seçenек tedavi edici antibiyotiklere karşı daha yüksek oranlarda direnç bildirilmektedir (12). Bu konuda Arıkan ve ark. yaptıkları çalışmada izole edilen *Salmonella* türlerinde AMP direncini %15,4, SXT direncini %5,1, CİP direncini %3,7 bulmuşlardır (13). Muhammed ve ark. yaptıkları bir çalışmada *Salmonella* türlerinde AMP direncini %30,4, SXT direncini %39,1, CİP direncini %4,3 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada ikili ve üçlü direncin ise arttığına vurgu yapılmıştır (14). Thung ve ark. yaptıkları bir çalışmada en az üç antibiyotiğe karşı çoklu direnç olduğunu bildirmişlerdir (15). Gündoğdu ve ark. 75 *Salmonella* izolatı ile yaptıkları çalışmada %55,7'sini ampisiline, %7,6'sını trimetoprim-sülfametoksazole, %7,6'sını siprofloksasine, %6,3'ünü sefotaksime ve %1,3'ü kloramfenikole dirençli saptamışlardır (5). Direnç ile ilgili çalışmalarda azitromisin' in *Salmonella* izolatlarına karşı daha iyi etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (12). McAteer ve ark. ABD'de 1999-2015 yılları arasında yaptıkları çalışmada *Salmonella* izolatlarında florokinolon direncini %61, çoklu ilaca direnç oranını da %22 bulmuşlardır. Seftriakson ve azitromisine de tüm izolatları duyarlı bulmuşlardır (16). *Salmonella* izolatları arasında, geleneksel birinci basamak antimikrobiyaller olan AMP, kinolonlar ve SXT'ye karşı direnç, genellikle plazmitlerde bulunan direnç belirleyicilerden kaynaklanır. AMP ve sefalosporin direnci sıklıkla β-laktamazlar ile meydana gelir. Kinolon ve SXT direnci de Topoizomerez ve

Dihidrofolat redüktaz (*dfr*) gibi genlerde mutasyon ile kazanılabilir (17). Biz bölgemizde yaptığımız bu çalışmada *S. enteritidis* ve *S. enteritidis* dışı izolatlarda AMP ve CIP direncini literatür ile uyumlu bulduk. SXT 'ye karşı direncin yapılan çalışmalara göre daha az olduğunu ancak yıllar içinde arttığını gözlemledik. Bunun dışında özellikle ikili ve üçlü direnç paterninin arttığını gözlemledik.

SONUÇ

Sonuç olarak, *Salmonella* enfeksiyonlarda ve direnç gelişiminde yıllar içerisinde artış eğilimi dikkat çekmektedir. Ülkemizde saptanan *Salmonella* izolatlarında serogrup tayini ve antibiyotik direncinin araştırılması epidemiyolojik verilerin oluşturulması açısından yararlı olacaktır. AMP ve kinolon direncinin diğer antibiyotiklere göre son dönemde daha fazla arttığını görmekteyiz. Bu sebeple *Salmonella* kaynaklı sepsis ve enterik ateş gibi klinik tablolarda antibiyotik duyarlılık sonuçları çıkıncaya kadar yapılacak ampirik tedavide SXT ve 3. kuşak sefalosporinlerin kullanılmasının uygun olabileceğini düşünebiliriz. Sonuç olarak, *Salmonella* türlerinde antibiyotik direncinin artması antibiyotik kullanılmasının gerektiği durumlarda, ampirik tedavi seçeneklerinin etkileneceğini belirtmektedir. Biz çalışmamızda on yıllık verileri retrospektif olarak inceledik. İzole edilme oranı ve direnç oranlarındaki artışı tespit ettik. *Salmonella* türlerindeki antibiyotik direncinin daha iyi izlenebilmesi için daha uzun süreli ve farklı bölgelerden çalışmalarla takibe ihtiyaç vardır.

Yazarların Katkıları: Fikir/Kavram: Y.T.Ç.; Tasarım: Y.T.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi: M.Y., İ.B.; Analiz ve/veya Yorum: Y.T.Ç., A.B.; Literatür Taraması: Y.T.Ç., C.Ç.; Makale Yazımı: İ.B., C.Ç., M.Y.; Eleştirel İnceleme: Y.T.Ç., A.B.

KAYNAKLAR

- Bula-Rudas FJ, Rathore MH, Maraqa NF. Salmonella infections in childhood. Adv Pediatr. 2015; 62(1): 29-58.
- Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen salmonella. Biomed Res Int. 2017; 1: 3782182.
- Yücel E. Salmonella enfeksiyonları; tanı ve tedavisi. Klinik Tıp Pediatri Derg. 2020; 12(3): 133-9.
- Mac Fadden DR, Bogoch I, Andrews RJ. Advances in diagnosis, treatment and prevention of invasive salmonella infections. Curr Opin Infect Dis. 2016; 29(5): 453-8.
- Gündoğdu A, Kilic H, Ulu-Kilic A, Parkan OM, Ture Z. Distribution and antimicrobial resistance of salmonella serovars isolated in Kayseri Region. KLİMİK Journal. 2017; 30(1): 22-7.
- Chaudhari R, Kanika S, Prashant K. Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in Salmonella spp. Res Microbiol. 2023; 174 (1-2): 103985.
- Yoke-Kqueen C, Learn-Han L, Noorzaleha AS, Son R, Sabrina S, Jiun-Horng S, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant Salmonella enterica subsp. enterica isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. Lett Appl Microbiol. 2008; 46(3): 318-24.
- Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in Life Science. 2015; 8(3): 284-93.
- Babacan O, Karadeniz H. Çiğ tavuk etlerinden izole edilen Salmonella spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. Veteriner Hekimler Derneği Derg. 2019; 90(2): 105-14.
- Akkaya NSS, Ak S. Tavuklarda salmonella serovaryları ve antibiyotik direnci. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg. 2024; 17(1): 81-6.
- Travers K, Barza M. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. Clin Infect Dis. 2002; 34 (Suppl 3): S131-4.
- Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Levent B, Albayrak HT, Şahiner F, et al. Salmonella ve shigella klinik izolatlarında azitromisin minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin ve karbapenem direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2021; 55(4): 480-91.
- Arıkan KÖ, Güven GB. Çocuklarda salmonella enfeksiyonları: klinik özellikler ve antibiyotik direnç profilinin yıllara göre değişimi. Forbes Tıp Derg. 2021; 2(2): 87-91.
- Mohammed Y, Dubie T. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility profile of Salmonella isolated from poultry farms in Addis Ababa, Ethiopia. Vet Med Sci. 2022; 8(3): 1166-73.
- Thung TY, Mahyudin NA, Basri DF, Wan Mohamed Radzi CW, Nakaguchi Y, Nishibuchi M et al. Prevalence and antibiotic resistance of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. Poultry Science. 2016; 95(8): 1888-93.
- McAteer J, Derado G, Hughes M, Bhatnagar A, Medalla F, Chatham-Stevens K, et al. Typhoid fever in the U.S. pediatric population, 1999-2015: opportunities for improvement. Clin Infect Dis. 2020; 73(11): e4581-e4589.
- Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive salmonella infections. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(4): 901-37.