

مطالعه‌ای بر فلور قارچی سطح چشم سالم در گاوهای بومی ایران

توحید نوری^۱، عبدالله عراقی سوره^{۲*}

۱- دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: a.araghi@iaurmia.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۳/۹/۸ پذیرش نهایی: ۹۳/۱۱/۱۸)

چکیده

فلور میکروبی سطح چشم سالم یکی از منابع تامین‌کننده عوامل قارچی برای ایجاد کراتومایکوز در حیوانات می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور شناسایی جدایه‌های قارچی سطح چشم سالم گاوهای بومی ایران در منطقه ارومیه انجام گرفت. سواب‌ها از هر دو چشم ۴۵ رأس گاو سالم گرفته شد و در محیط ساپرو دکستروز آگار کلرامفنیکل دار و عصاره مالت کشت گردید. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز نگهداری شد. اثر سن و جنس بر نتایج به‌دست آمده با استفاده از آزمون دقیق فیشر مورد تحلیل آماری قرار گرفت. از گاوهای بررسی شده تعداد ۱۳ رأس (۲۸/۸۹٪) برای کشت قارچی چشم‌ها مثبت بودند. جدایه‌ها شامل جنس‌های آسپرژیلوس از ۷ رأس (۵۳/۸۴٪)، پنی‌سیلیوم از ۶ رأس (۴۶/۱۵٪)، رودوتورولا از ۱ رأس (۷/۶۹٪) و کاندیدا از ۱ رأس (۷/۶۹٪) بودند. مخمرها ۱۳/۳٪ از کل جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند. سن و جنس گاو تاثیر معنی‌دار روی فراوانی جدایه‌ها نداشت. در کل، میزان آلودگی قارچی سطح چشم گاوها در مقایسه با مطالعات مشابه پائین بود که می‌تواند انعکاس تفاوت موجود در روش و فصل نمونه‌برداری باشد. فراوانی غیرمعمول آسپرژیلوس در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های جغرافیایی باشد.

کلید واژه‌ها: فلور قارچی، ملتحمه، گاو بومی، ایران، ارومیه.

مقدمه

(Ratson *et al.*, 2013) گزارش شده است. استفاده موضعی از داروهای مختلف مانند کورتیکواستروئیدها و پادزیست‌ها برای درمان بیماری‌های گوناگون خارجی چشم و ضعف ذاتی مکانیسم‌های دفاعی سطح چشم اسب‌ها از عوامل مهم فراوانی کراتومایکوز در این گونه

عفونت‌های قارچی قرنیه (کراتومایکوز) در میان حیوانات اهلی به فراوانی در اسب‌ها (Brooks *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2007; Iedbetter *et al.*, 1998) و به ندرت در گاوها (Voelter- *et al.*, 2006; Elligott *et al.*, 2006)

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و کشت

مطالعه حاضر در زمستان ۱۳۹۱ (بهمن ماه) به مدت ۳ روز روی ۴۵ رأس گاو بومی ارجاعی به کشتارگاه شهرستان ارومیه (شمال غرب ایران) انجام گرفت. گاوها از دو جنس نر با فراوانی ۲۶ رأس (۵۷/۷۸٪) و جنس ماده با فراوانی ۱۹ رأس (۴۲/۲۲٪) و در گروه‌های سنی زیر دو سال (۲۱ رأس، ۶۷/۶۷٪) و بالای دو سال (۲۴ رأس، ۵۳/۳۳٪) مورد مطالعه قرار گرفتند. چشم و بافت‌های اطراف آن به دقت مورد مشاهده و معاینه قرار می‌گرفت و در صورت وجود هر گونه نشانه بیماری، حیوان مورد نظر از مطالعه خارج می‌گردید. با فشار انگشت روی کره چشم از روی پلک بالا و ظاهر شدن پلک سوم، با استفاده از سواب‌های خشک و استریل از سطح داخلی پلک سوم نمونه‌برداری انجام می‌شد. دقت کافی در عدم برخورد سواب با مژه‌ها و پوست پلک‌ها به عمل می‌آمد. سواب‌های اخذ شده درون لوله‌های استریل واجد آب پیتونه در مجاورت یخ هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل می‌گردید. در آزمایشگاه سواب‌ها در محیط سابرودکستروز آگار واجد کلرامفنیکل (HiMedia, India) و عصاره مالت (Quelab, Canada) کشت داده شده و پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگاه‌داری می‌شدند. در صورت رشد پرگنه‌های قارچی از نظر رنگ، شکل و اندازه بررسی می‌شدند و پاساژهایی جهت جداسازی و خالص‌سازی پرگنه‌های قارچی انجام می‌شد. برای شناسایی قارچ‌های رشد کرده از روش رنگ‌آمیزی لاکتوفنل و کاتن بلو، کشت روی

حیوانی است (Nasissse and Nelms, 1992). محیط اطراف اسب‌ها نیز نقش به‌سزایی در این خصوص ایفا می‌کند. وقوع آسیب‌های ضربه‌ای قرنیه و تماس آن با خاک‌های آلوده و مواد گیاهی (به‌عنوان منبعی از هاگ‌های قارچی) در اسب معمول می‌باشد (Gaarder et al., 1998). تشخیص سریع کراتومایکوز به کلینیسین این اجازه را می‌دهد که مداخله درمانی خود را قبل از ایجاد جراحات برگشت‌ناپذیر آغاز کند. از آنجایی که قارچ‌های جدا شده از اکثر موارد کراتومایکوز مشابه جدایه‌های قارچی سطح چشم‌های سالم می‌باشد (Brooks et al., 1998)، بنابراین شناخت فلور قارچی چشم حیوانات سالم در پیش‌بینی عوامل مسئول در ایجاد کراتومایکوز و انتخاب داروهای ضدقارچی مناسب مفید واقع خواهد شد. فلور قارچی سطح چشم سالم در بسیاری از حیوانات از جمله گاو بررسی شده است (Samuelson et al., 1984; Sgorbini et al., 2010). قارچ‌های کلادوسپوریوم، پنی‌سیلیوم، اسپرژیلوس و اسکوپولاریوپسیس جدایه‌های غالب کیسه ملتحمه گاوهای سالم می‌باشند. ترکیب فلور قارچی سطح چشم تحت تأثیر محیط اطراف دام بوده و ممکن است بر اساس تنوع جغرافیایی و فصل سال تغییر کند (Riss, 1981). بر اساس بررسی منابع موجود، تاکنون گزارشی از فلور قارچی سطح خارجی چشم گاوها در ایران وجود ندارد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی جدایه‌های قارچی از سطح چشم سالم گاوهای بومی ایران در شرایط جغرافیایی شهرستان ارومیه و بررسی تأثیر سن و جنس میزبان بر فراوانی این جدایه‌ها می‌باشد.

یک رأس (۷/۶۹٪) برای هر دو چشم مثبت بود. در کل، ۴ جنس مختلف قارچی از ۱۴ چشم (۱۵/۵۵٪) جدا گردید (جدول ۱). جنس اسپرژیلوس با فراوانی ۷ مورد (۴۶/۶۷٪) از کل جدایه‌ها) بیشترین جدایه قارچی چشم گاوهای بومی سالم بود. مخمرها (۲ جنس) ۱۳/۳٪ از کل جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند.

بر اساس آزمون آماری دقیق فیشر (جدول ۱) فراوانی هیچ‌کدام از جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری مابین گروه‌های سنی و جنس‌های مختلف نشان ندادند.

لام و تست‌های بیوشیمیایی برای مخمرها استفاده گردید (Quinn et al., 1994).

تحلیل آماری داده‌ها

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ و آزمون دقیق فیشر مورد بررسی قرار گرفت. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در بررسی‌های انجام شده روی چشم ۴۵ رأس گاو سالم، تعداد ۱۳ رأس (۲۸/۸۹٪) واجد کشت مثبت قارچی بودند. از گاوهای مثبت برای کشت قارچی فقط

جدول ۱- جدول فراوانی مطلق و نسبی جدایه‌های قارچی ملتحمه گاوهای بومی ایران در شهرستان ارومیه و آنالیز فراوانی بر حسب جنس و گروه سنی

فراوانی جدایه (%)							کل	قارچ
سن		جنس		ارزش p	ماده	نر		
بالای یکسال (۲۴ رأس)	زیر یکسال (۲۱ رأس)	ارزش p	(۱۹ رأس)				(۲۶ رأس)	
۰/۳۴۸	۲	۴	۰/۶۷۸	۳	۳	۶	<i>Penicillium spp</i> (۴۰)	
۰/۴۹۸	۳	۲	۰/۴۳۲	۳	۲	۵	<i>Aspergillus fumigatus</i> (۳۳/۳۴)	
۰/۵۲۳	۱	۱	۰/۴۰۳	-	۲	۲	<i>Aspergillus flavus</i> (۱۳/۳۴)	
۰/۴۲۳	۱	-	۰/۳۸۷	۱	-	۱	<i>Rhodotorula sp</i> (۶/۶۷)	
۰/۴۲۳	۱	-	۰/۳۸۷	۱	-	۱	<i>Candida sp</i> (۶/۶۷)	
۰/۷۵۶	۸	۷	۰/۴۷۶	۶	۹	۱۵	مجموع (۱۰۰٪)	

مطالعه حاضر ۲۸/۸۹٪ از گاوهای تحت بررسی برای کشت قارچی چشم مثبت بودند. در مطالعه سامونلسون و همکاران روی ۲۵ رأس گاو، این رقم ۱۰۰٪ گزارش

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اولین گزارش در خصوص جدایه‌های قارچی چشم گاوهای ایران و سومین گزارش از جدایه‌های قارچی چشم گاوها در جهان می‌باشد. در

گاوهای سالم در امریکا، قارچ کلادوسپوریوم (Samuelson *et al.*, 1984) و در گاوهای ایتالیا قارچ پنی‌سیلیوم گزارش شده است (Sgorbini *et al.*, 2010). در بررسی‌های انجام شده در منطقه ارومیه روی فلور قارچی چشم دیگر دام‌های بزرگ جثه نظیر گاو میش (Araghi-Sooreh and Mohammadi, 2013)، اسب و قاطر (عراقی سوره، ۱۳۹۲) نیز قارچ آسپرژیلوس جدایه غالب گزارش شده است. مشابهت فلور قارچی چشم در گونه‌های مختلف دامی در جغرافیای یکسان و تفاوت آن در گونه دامی یکسان در جغرافیای متفاوت، می‌تواند حاکی از تأثیر پایه‌ای شرایط جغرافیایی در ترکیب فلور قارچی چشم حیوانات باشد.

آسپرژیلوس به فراوانی در اسب‌ها (Andrew *et al.*, 1998; Coad *et al.*, 1985; Gaarder *et al.*, 1998) و دیگر حیوانات از جمله گاو (Elligott *et al.*, 2006) و گربه (Smith *et al.*, 2010) مهم‌ترین عامل عفونت‌های قارچی قرنیه گزارش شده است.

علاوه بر آسپرژیلوس، دیگر قارچ‌ها نظیر فوزاریوم، پنی‌سیلیوم، رایزوپوس و تریکوسپورون، سیلیندروکارپون، اسکیتالیدیوم و مخمرهای کاندیدا، رودتورلا و تورولوپسیس از کراتومایکوز حیوانات مختلف جدا شده‌اند (McLaughlin *et al.*, 1983; Coad *et al.*, 1985; Casolari *et al.*, 1992; Ledbetter *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد تمامی قارچ‌های ساپروفیت جدا شده در تحقیق حاضر به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت طلب در ایجاد کراتومایکوز حیوانات مطرح باشند. بنابراین با در نظر گرفتن فراوانی آسپرژیلوس در سطح چشم گاوهای تحت مطالعه، باید در درمان آغازین کراتومایکوز گاوهای منطقه توجه ویژه‌ای به این ارگانسیم معطوف گردد.

شده است (Samuelson *et al.*, 1984). در بررسی‌های انجام شده روی فلور قارچی دیگر حیوانات بزرگ جثه نیز نتایج مشابه با مطالعه قبلی به دست آمده است، به طوری که این رقم برای چشم گاو میش‌ها ۱۰۰٪ (Araghi-Sooreh and Mohammadi, 2013)، اسب‌ها ۹۵٪ (Samuelson *et al.*, 1984)، قاطر‌ها ۸۴٪ (Araghi-Sooreh, 2013) و الاغ‌ها ۷۹٪ (Nardoni *et al.*, 2007) می‌باشد. علت پائین بودن فراوانی آلودگی قارچی سطح چشم گاوها در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات مشابه را می‌توان در تفاوت‌های موجود در روش نمونه‌گیری و فصل نمونه‌گیری جستجو کرد. برخلاف دیگر مطالعات که در آن‌ها به‌طور معمول نمونه‌گیری از کیسه تحتانی ملتحمه چشم انجام گرفته است، در تحقیق حاضر محل اخذ نمونه‌های چشمی سطح داخلی پلک سوم می‌باشد. به نظر می‌رسد چون سطح داخلی پلک سوم کمتر از کیسه ملتحمه در معرض تماس با محیط اطراف دام قرار دارد، کمتر دچار آلودگی قارچی می‌گردد. در خصوص تاثیر فصل باید ذکر کرد که در مطالعات قبلی عموماً نمونه‌گیری در فصول گرم سال انجام گرفته است در حالی که، در بررسی حاضر فصل نمونه‌گیری زمستان می‌باشد. احتمالاً سردی هوا با کاهش هاگ‌زایی قارچ‌های ساپروفیت موجود در محیط اطراف دام، از میزان آلودگی سطح چشم گاوهای تحت مطالعه کاسته است.

قارچ‌های جدا شده در تحقیق حاضر قابل مقایسه با جدایه‌های گزارش شده در مطالعات مشابه روی گاوهای دیگر کشورها می‌باشد (جدول ۲)، لیکن برخلاف آن‌ها جدایه غالب چشم گاوهای ایرانی قارچ آسپرژیلوس می‌باشد. فراوان‌ترین جدایه قارچی ملتحمه

است. چگونگی تأثیر جنسیت میزبان بر فراوانی جدایه‌های میکروبی سطح چشم مشخص نیست ولی در خصوص تأثیر سن می‌توان بیان کرد که با افزایش سن و تقویت سازوکارهای دفاعی چشم از کلونیزاسیون قارچی سطح چشم حیوانات مسن‌تر کاسته می‌شود. گونه‌های قارچی جدا شده در گزارش حاضر قابل مقایسه با مطالعات مشابه انجام گرفته روی گاوهای دیگر نقاط دنیا است، اگر چه فراوانی بیشتر آسپرژیلوس می‌تواند ناشی از تفاوت‌های جغرافیایی باشد. پائین بودن آلودگی قارچی سطح چشم گاوهای تحت مطالعه می‌تواند انعکاس تفاوت‌ها در تکنیک و فصل نمونه‌برداری باشد.

در مطالعه حاضر سن و جنس گاوها تأثیر معنی‌دار بر فراوانی جدایه‌های قارچی کیسه ملتحمه نشان نداد. اما در پژوهش‌های متعدد شاهد تأثیر سن و جنس میزبان بر ترکیب و فراوانی فلور میکروبی ملتحمه حیوانات مختلف هستیم. در اسب‌های فلوریدای آمریکا (Andrew *et al.*, 2003)، قارچ‌ها از چشم حیوانات جوان‌تر بیشتر جدا گردیده است. در بزهای ارومیه قارچ‌ها از چشم حیوانات نر به طور معنی‌داری بیشتر گزارش شده است (عراقی سوره و همکاران، ۱۳۹۲). در اسب‌های عرب واقع در تبریز (عراقی سوره و همکاران، ۱۳۹۱)، پزودوآلشیریا و کلادوسپوریوم در نرها و در گوسفندان ارومیه (عراقی سوره و حسن پور، ۱۳۹۱) کلادوسپوریوم فراوانی معنی‌دار در ماده‌ها داشته

جدول ۲- قارچ‌های جدا شده از کیسه ملتحمه گاوهای سالم در کشورهای مختلف به ترتیب فراوانی

ایالات متحده (Samuelson <i>et al.</i> , 1984)	ایتالیا (Sgorbini <i>et al.</i> , 2010)
<i>Cladosporium</i> spp	<i>Penicillium</i> spp
<i>Penicillium</i> spp	<i>Cladosporium</i> spp
<i>Scopulariopsis</i> spp	<i>Aspergillus</i> spp
<i>Helminthosporium</i> spp	<i>Alternaria</i> spp
<i>Curvularia</i> spp	<i>Mucor</i> spp
<i>Fusarium</i> spp	<i>Acremonium</i> spp
<i>Candida</i> spp	<i>Absidia</i> spp
<i>Alternaria</i> spp	<i>Fusarium</i> spp
<i>Aspergillus</i> spp	<i>Trichoderma</i> spp
<i>Exosporiella</i> spp	<i>Candida</i> spp
<i>Drechslera</i> spp	<i>Mortierella</i> spp
<i>Histoplasma</i> spp	<i>Actinomucor</i> spp
<i>Torula</i> spp	<i>Curvularia</i> spp
-	<i>Rhizomucor</i> spp
-	<i>Trichosporon</i> spp

سپاسگزاری بدین وسیله از جناب آقای مهندس دلشاد برای کمک در پروسه کشت و از جناب آقای دکتر صادقی برای شناسایی جدایه‌ها تشکر و قدرانی می‌گردد.

منابع

- عراقی سوره، ع. (۱۳۹۲). شناسایی فلور قارچی فورنیکس ملتحمه چشم در تک سمیان (اسب و قاطر) منطقه ارومیه. مجله آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی، سال ۷، شماره ۱، صفحات: ۱۷۴۲-۱۷۳۶.
- عراقی سوره، ع.، مخبر دزفولی، م.ر. و محمدی چورسی، م. (۱۳۹۲). شناسایی جدایه‌های قارچی کیسه ملتحمه چشم بزهای سالم. مجله تحقیقات دامپزشکی، سال ۶۸، شماره ۳، صفحات: ۱۲۲-۱۰۷.
- عراقی سوره، ع.، ابراهیمی حامد، م.، محمد پور، د. و صادقی زالی، م.ح. (۱۳۹۱). جداسازی و شناسایی فلور قارچی ملتحمه چشم سالم در اسب عرب ایرانی. مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، سال ۹، شماره ۴، صفحات: ۸۱۶-۸۱۱.
- عراقی سوره، ع. و حسن پور، و. (۱۳۹۱). فلور قارچی کیسه ملتحمه گوسفندان سالم نژاد قزل در شهرستان ارومیه. مجله پژوهش‌های بالینی دامپزشکی، سال ۳، شماره ۲، صفحات: ۹۵-۱۰۱.
- Araghi-Sooreh, A. (2013). Fungi in the conjunctival sac of healthy mules (*Equus mulus*). In proceeding of the 2nd International Congress of Large Animal Practitioners, Tehran, Iran, pp: 99.
- Araghi-Sooreh, A. and Mohammadi, N. (2013). Colonization of the normal conjunctiva in Iranian river buffalo by fungi. In proceeding of the 2nd International Congress of Large Animal Practitioners, Tehran, Iran, pp: 98.
- Andrew, S.E., Nguyen, A., Jones, G.L. and Brooks, D.E. (2003). Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Veterinary Ophthalmology*, 6(1): 45-50.
- Andrew, S.E., Brooks, D.E., Smith, P.J., Gelatt, K.N., Chmielewski, N.T. and Whittaker, C.J.G. (1998). Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987-1996). *Equine Veterinary Journal*, 30(2): 109-116.
- Brooks, B.E., Andrew, S.E., Andrew, S.E., Dillavou, C.L., Ellis, G. and Kubilis, P.S. (1998). Antimicrobial susceptibility patterns of fungi isolated from horses with ulcerative keratomycosis. *American Journal of Veterinary Research*, 59(2): 138-142.
- Coad, C.T., Robinson, N.M. and Wilhelmus, K.R. (1985). Antifungal sensitivity testing for equine Keratomycosis. *American Journal of Veterinary Research*, 46(3): 676-678.
- Casolari, C., Nanetti, A., Cavallini, G.M., Rivasi, F., Fabio, U. and Mazzoni, A. (1992). Keratomycosis with an unusual aetiology (*Rhodotorula glutinis*): a case report. *Microbiology*, 15(1): 83-87.
- Elligott, C.R., Wilkie, D.A., Kuonen, V.J., Bras, I.D. and Neihaus, A. (2006). Primary Aspergillus and Fusarium keratitis in a Holstein cow. *Veterinary Ophthalmology*, 9(3): 175-178.
- Gaarder, J.E., Rebhun, W.C., Ball, M.A., Patten, V., Shin S. and Erb, H. (1998). Clinical appearances, healing patterns, risk factors, and outcomes of horses with fungal keratitis: 53 cases (1978-1996). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213(1): 105-113.

- Ledbetter, E.C., Patten, V.H., Scarlett, J.A. and Vermeulen, F.M. (2007). In vitro susceptibility patterns of fungi associated with keratomycosis in horses of the northeastern United States: 68 cases (1987-2006). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 231(7): 1086-1091.
- McLaughlin, S.A., Brightman, A.H., Helper, L.C., Manning, J.P. and Tomes, J.E. (1983). Pathogenic bacteria and fungi associated with extraocular disease in the horse. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 182(3): 241-242.
- Nardoni, S., Sgorbini, M., Barsotti, G., Corazza, M. and Mancianti, F. (2007). Conjunctival fungal flora in healthy donkeys. *Veterinary Ophthalmology*, 10(4): 207-210.
- Nasisse, M.P. and Nelms, S. (1992). Equine ulcerative keratitis. *Veterinary Clinic North America Equine Practice*, 8(3): 537-555.
- Quinn, P.J., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing, pp: 367-421.
- Reed, Z., Thomasy, S.M., Good, K.L., Maggs, D.J., Magdesian, K.G., Pusterla, N., *et al.* (2013). Equine keratomycosis in California from 1987 to 2010 (47 cases). *Equine Veterinary Research*, 45(3): 361-366.
- Riss, R.C. (1981). *Equine ophthalmology*. Philadelphia: Lea and Febiger, pp: 575.
- Sgorbini, M., Barsotti, G., Nardoni, S., Brombin, M., Sbrana, A., Mancianti, F., *et al.* (2010). Seasonal prevalence of fungi in the conjunctival fornix of healthy cows during a 2-year study. *Veterinary Ophthalmology*, 13(4): 227-234.
- Samuelson, D.A., Andresen, T.L. and Gwin, R.M. (1984). Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 184(10): 1240-1242.
- Smith, L.N. and Hoffman, S.B. (2010). A case series of unilateral orbital Aspergillosis in three cats and treatment with voriconazole. *Veterinary Ophthalmology*, 13(4): 227-234.
- Voelter-Ratson, K., Monod, M., Braun, U. and Spiess, B.M. (2013). Ulcerative fungal Keratitis in a Brown Swiss cow. *Veterinary Ophthalmology*, 16(6): 464-466.

