

بررسی میزان آلودگی سالمونلای تخم اردک و بوقلمون های مصرفی در استان فارس

علی قربانی رنجبری^{۱*}، شهریار ناجی^۱، عبدالله زارعی^۱، نازنین قربانی رنجبری^۱
۱-دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، کازرون، ایران.

یافته / دوره هفدهم / شماره ۱ / بهار ۹۴ / مسلسل ۶۳

چکیده

دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۲ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۱۵

*** مقدمه :** سالمونلاها اجرام میله ای کوتاه، گرم منفی، فاقد کپسول، هوازی و بی هوازی اختیاری هستند که در انسان سبب ایجاد مسمومیت غذایی می شود. در انتقال این بیماری، مواد غذایی خام با منشاء دامی به ویژه گوشت و تخم پرندگان حائز اهمیت فراوانی هستند. با توجه به اهمیت تخم اردک و بوقلمون در انتقال سالمونلوزیس و مصرف تخم اردک و بوقلمون های محلی و غیر صنعتی در منطقه، همچنین پی بردن به میزان آلودگی سالمونلای مطالعه حاضر صورت پذیرفت.

*** مواد و روش ها:** به منظور مطالعه حاضر، ۳۰۰ عدد تخم اردک و بوقلمون های بومی جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید؛ در آزمایشگاه پس از نمونه گیری از سطح تخم های مورد بررسی، پوسته آنها با اتانول ۸۰ درصد ضد عفونی و محتویات هر ۵ عدد تخم اردک و بوقلمون به صورت جداگانه در یک بشر مخلوط گشته و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C با سوآب در آبگوشت سلنیت-F تلقیح گردید. نمونه از محیط سلنیت-F به آگار سالمونلا-شیکلا منتقل شد و پس از انکوباسون در 37°C از نظر کلنی های مشکوک به سالمونلا بررسی شدند. کلنی های مشکوک در محیط های TSI و لیزین دکربوکسیلاز تلقیح و باکتری هایی که دارای واکنش های مربوط به سالمونلا بودند بوسیله آزمایش PCR با پرایمرهای اختصاصی برای سالمونلاها و سروتیپ های سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گرفتند.

*** یافته ها:** از مجموع ۳۰۰ تخم اردک و بوقلمون مورد بررسی پوسته ۷ مورد (۳/۲ درصد) آلوده به سالمونلا بود. از ۷ مورد آلودگی ۱ مورد پوسته تخم بوقلمون آلوده به سالمونلا تیفی موریوم بود. از طرفی ۶ مورد آلودگی مربوط به پوسته تخم اردک های مورد مطالعه بود که همگی از سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم بودند.

*** بحث و نتیجه گیری:** با توجه به مطالعه حاضر و تحقیق سایر محققین در مجموع می توان نتیجه گرفت میزان عفونت سالمونلا در تخم اردک و بوقلمون نسبت به تخم ماکیان کمتر بوده و به نظر می رسد انتقال عمودی سالمونلا در بوقلمون و اردک کمتر از ماکیان باشد.

*** واژه های کلیدی:** سالمونلا، پوسته تخم مرغ، اردک، بوقلمون.

*آدرس مکاتبه نویسنده مسئول: کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده دامپزشکی.

پست الکترونیک: dr_alighorbani87@yahoo.com

مقدمه

سالمونلاها دسته بزرگی از باسیل های گرم منفی اند که اندازه آنها به طول ۱ تا ۳ و عرض آنها ۰/۵ تا ۰/۸ میکرون می باشد. غیراز دو سروتیپ سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پولوروم، مابقی دارای آنتی ژن H مربوط به تاژک بوده و توانایی حرکت را دارند (۱،۲). سالمونلاها مقاومت بالایی به عوامل شیمیایی نظیر غلظت زیاد صفر و همچنین عوامل فیزیکی نظیر حرارت و مواد ضد عفونی کننده را دارا می باشند. طبق بررسی تاج بخش و نظری سالمونلا آبرتوس اویس می تواند تا بیش از ۵ ماه حیات و توان بیماری زایی خود را در خاک حفظ نماید (۳). تا کنون بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ از سالمونلا ها شناسایی شده اند (۴). در طیور سالمونلا ها به صورت عمودی و افقی منتقل می شوند و معمولاً عفونت های پایداری را در سطح گله های آلوده ایجاد می کنند. سروتیپ های مختلف سالمونلا باعث بیماری هایی چون پولوروم که عامل آن سالمونلا پولوروم می باشد هستند. انتقال این نوع سروتیپ بیشتر به صورت عمودی است. تیفوئید مرغان توسط سالمونلا گالیناروم ایجاد می شود که انتقال بیشتر به صورت افقی و از مدفوع پرندگان حامل می باشد. پاراتیفوئید بیماری است که دارای علائمی مشابه پولوروم و دارای اهمیت زیاد می باشد؛ زیرا عوامل ایجاد کننده آن به ترتیب سالمونلا تیفی موریوم، انتریتیدیس، سالمونلا هاوانا و ... می باشند. از آنجایی که این عوامل بخصوص سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس به میزبان خاصی عادت نکرده اند و به عنوان مهمترین گونه های دخیل در عفونت های سالمونلایی انسانی محسوب می شوند (۵،۶). بررسی ها نشان می دهند که سالمونلا انتریتیدیس در اغلب اپیدمی های سالمونلوز با منشاء تخم مرغی دخالت دارد (۷،۸). سالمونلا انتریتیدیس می تواند محتویات تخم مرغ را در نتیجه عفونت بافت تولید مثلی مرغان تخم گذار آلوده نماید. به نظر می رسد مکان عمده عفونت، قسمت فوقانی اوویداکت باشد (۹). دیگر سروتیپ های پاراتیفوئید شامل سروتیپ مقاوم به آنتی بیوتیک، سالمونلا تیفی موریوم نیز می تواند در تخم مرغ جایگزین شود (۱۰). مصرف تخم مرغ آلوده از مهمترین منابع عفونت سالمونلایی می باشد

(۱۱،۱۲). باکتری سالمونلا سخت رشد نبوده و از محیط، نمونه کلینیکی و مواد غذایی بعد از مرحله غنی سازی جدا می شود و تکنیک PCR نتایج سریع و دقیقی را در تشخیص باکتری فراهم می نماید (۱۳،۱۴). با توجه به اهمیت آلودگی های سالمونلایی در صنعت پرورش طیور، بهداشت عمومی و نیز افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری سالمونلا (۱۹-۱۵) مطالعه حاضر به منظور شناسایی آلودگی تخم اردک و بوقلمون های محلی نواحی اطراف شیراز به سالمونلا با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

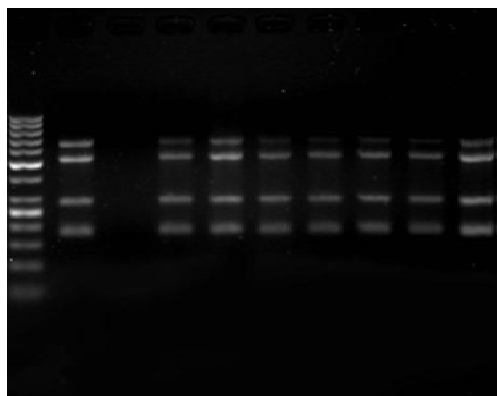
برای جداسازی باکتری سالمونلا، تعداد ۳۰۰ عدد تخم اردک و بوقلمون هر کدام ۱۵۰ عدد در فصل بهار و پاییز از نواحی اطراف شیراز جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گشتند. در آزمایشگاه سطح پوسته تخم پس از نمونه گیری تمیز و با استفاده از اتانول ۸۰ درصد ضد عفونی گشتند. پوسته آهکی با قیچی استریل شکسته و محتویات هر ۵ عدد تخم اردک و بوقلمون به صورت جداگانه در یک بشر شیشه ای استریل مخلوط شدند. این مخلوط پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای C ۳۷، با سوآب به محیط سلنیت-F به منظور غنی سازی تلقیح شد و برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای C ۳۷ مورد انکوباسیون قرار گرفت. پس از خروج از انکوباسیون بر روی محیط کشت جامد سالمونلا - شگیلا آگار که حاوی پروتئین، لاکتوز، آهن، معرف NATRAL - RED می باشد به صورت سطحی کشت گردید. محیط سالمونلا - شگیلا آگار برای مدت ۲۴ ساعت در دمای C ۳۷ مورد انکوباسیون قرار گرفت و سپس از نظر کلنی های مشکوک به سالمونلا بررسی شد. در صورت منفی بودن نتیجه، انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت دیگر ادامه پیدا می کرد. نمونه هایی که پس از این مدت فاقد کلنی های مشکوک به صورت رنگ پریده یا زرد با مرکزی خاکستری و سیاه بودند منفی تلقی و حذف می شدند. سپس کلونی های نمونه های مشکوک را از محیط سالمونلا - شگیلا آگار برداشته و به صورت سطحی و عمقی در محیط کشت TSI کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، کلنی های مشکوک

جدول ۱. توالی‌های اولیگونوکلئوتید های مورد استفاده به عنوان پرایمر و طول محصول در واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

پرایمر	توالی (3'-5')	طول محصول	رفرانس
invA-1 invA-2	TTGTTACGGCTATTT TGACCA	۵۲۱	(۲۲)
	CTGACTGCTACCTTG CTGATG		
	GCAGCGGTTACTATT GCAGC		
SefA-1 SefA-2	TGTGACACGGACATT TAGCG	330	(۲۲)
	GCGCCGCTCAGCCGA ACCA		
	GCAGCAGAAGCCCA G		
PefA-1 PefA-2	GCAGCAGAAGCCCA G	157	(۲۳)
	GAAACAGTG		

یافته ها

از مجموع ۳۰۰ تخم اردک و بوقلمون مورد بررسی پوسته ۷ مورد (۳/۲ درصد) آلوده به سالمونلا بود. اما محتویات هیچ یک از تخم‌های مورد بررسی آلوده به سالمونلا نبود. از ۷ مورد آلودگی ۱ مورد مربوط به پوسته تخم بوقلمون بود (۰/۶۶ درصد) که در فصل بهار جدا گردید. از طرفی ۶ مورد (۴ درصد) آلودگی مربوط به تخم اردک های مورد مطالعه ۴ مورد در فصل تابستان و ۲ مورد در فصل بهار آلوده به سالمونلا بودند. از طرفی تمامی سالمونلاهای جدا سازی شده از سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم بودند (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز برای شناسایی سالمونلا. ۱ نردبان ۱۰۰ جفت بازی (نشانگر)، ۲ کنترل مثبت (سالمونلا تیفی موریوم)، باند ۳ کنترل منفی، باندهای ۱۰-۴ نمونه های جدا سازی شده از پوسته تخم اردک و بوقلمون.

به صورت آلکالاین / اسید یعنی بالا قرمز و پایین زرد بودند و در تمامی سالمونلاها بجز پاراتیفی A در محیط TSI ایجاد گاز H₂S کرده که محیط TSI را به رنگ سیاه در می آورد. همزمان تست LIA نیز انجام شد که سالمونلاها تمام محیط را به رنگ ارغوانی در آوردند. همچنین از کلنی های مشکوک گسترش تهیه گردید که به روش گرم رنگ آمیزی شدند. چنانچه باکتری میله ای گرم منفی مشاهده می گردید از آن کشت خالص تهیه شده و بر اساس روش کوین و همکاران (۲۰۰۲) برای وجود سالمونلا مورد بررسی قرار می گرفت (۲۰).

شناسایی باکتری سالمونلا و سروتیپ‌های سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم به وسیله تست PCR

برای استخراج DNA از سالمونلاهای شناسایی شده فوق سوسپانسیون از کلنی در آب مقطر استریل تهیه گردید. سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و از رسوب با روش فنل- کلروفرم ژنوم باکتری استخراج گردید (۲۱). ژنوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن تهاجم (invA) برای شناسایی سالمونلاها مورد PCR قرار گرفت. برای تعیین سروتیپ، از پرایمرهای ژن فیمبریا (sefA)، برای سالمونلاها انتریتیدیس و از پرایمرهای ژن ویربولانس فیمبریا (pefA) برای سالمونلا تیفی موریوم در PCR استفاده گردید (جدول ۱). محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و از مارکر ۱۰۰ جفت بازی برای تعیین وزن مولکولی قطعات DNA استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید که یک رنگ فلوروسانس است انجام شد و از دستگاه تابش اشعه UV برای مشاهده باند های درخشان زیر نور ماورای بنفش استفاده گردید (۲۱).

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر از مجموع ۳۰۰ تخم اردک و بوقلمون مورد بررسی پوسته ۷ مورد (۳/۲ درصد) آلوده به سالمونلا بود. از ۷ مورد آلودگی ۱ مورد مربوط به پوسته تخم بوقلمون (۰/۶۶ درصد) و آلوده به سالمونلا تیفی موریوم بود. نایاک و همکاران در سال ۲۰۰۳ در ایالات آرکانزاس آمریکا به جداسازی و توصیف سالمونلای جداسازی شده از تولیدات بوقلمون پرداختند. در این بررسی از سکوم بوقلمون، محتویات چینه دان، مدفوع، آب آشامیدنی، هوا، غذا دهندگان بوقلمون‌ها و محیط پرورش نمونه گیری انجام شد و بر اساس روش‌های میکروبیولوژی و سرولوژیکی استفاده شده، جداسازی، تشخیص و تأیید حضور یا عدم حضور سالمونلا صورت گرفت. در این کار میزان سالمونلای جداسازی شده از مدفوع ۱۳ درصد، سکوم ۱۱ درصد، آب آشامیدنی ۱۰ درصد، سوآب محیطی ۵ درصد و نمونه گیری از غذا دهندگان ۱ درصد بوده است که پس از تعیین سروتیپ، سالمونلا هادلبرگ ۶۵ درصد، سالمونلا سنتن برگ ۱۹ درصد، سالمونلا مونستر ۱۰ درصد، سالمونلا آناتوم ۳ درصد و سالمونلا ورتینگون ۳ درصد تشخیص داده شد (۲۴). دیوید و همکاران در سال ۱۹۹۳ سروتیپ سالمونلای جداسازی شده از بوقلمون را با سروتیپ‌های جداسازی شده در انسان مورد مقایسه قرار دادند و تنها سالمونلا هیدلبرگ بین بوقلمون و انسان مشترک بود (۲۵). همچنین در مطالعه ای توسط والتر در سال ۲۰۰۰ در آمریکا، یک مسمومیت غذایی در یک خانواده را مورد بررسی قرار داد و توانست سالمونلا انتریتیدیس را از لاشه بوقلمون جدا کند (۲۶). بررسی منابع نشان می‌دهد که در خصوص آلودگی تخم بوقلمون به سالمونلا مطالعات بسیار محدودی انجام گرفته است و بیشترین مطالعات در این رابطه مربوط به سایر پرندگان به خصوص ماکیان است. لذا آلودگی پوسته تخم بوقلمون به سالمونلا تیفی موریوم در مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران می‌باشد و این آلودگی می‌تواند به دلیل آلودگی محیطی و آلوده شدن پوست تخم بوقلمون باشد. در خصوص تخم اردک مورد بررسی نیز ۶ مورد از پوسته تخم اردک‌ها

آلوده به سالمونلا تیفی موریوم بودند که با مطالعه اسدی در سال ۱۳۸۳، که ۱۰۰ عدد تخم اردک را از نظر آلودگی سطح خارجی پوسته و محتویات تخم به باکتری سالمونلا مورد بررسی قرار داد و توانست سالمونلا تیفی موریوم را از سطح خارجی پوسته ۳ عدد تخم اردک جدا نمایند (۲۷) همخوانی دارد. همچنین یومین فو و همکاران در سال ۱۹۹۳ در تایوان شیوع سالمونلا در تخم اردک را بررسی کردند. در این بررسی ۱۱۵ عدد تخم اردک از ۶ مزرعه در استان های تایپی و لان کشور تایوان مورد بررسی قرار گرفت که ۳۴ تخم اردک نمک سود شده و ۴۴ هزار تخم از مغازه های خرده فروشی در تایوان شمالی بودند. سالمونلا در هیچ یک از نمونه های زرده تخم اردک جداسازی نشد. در مجموع نمونه برداری از ۵۰ نمونه پوسته تخم مرغ و ۷ نمونه پوسته تخم اردک و ۲۳ نمونه از محیط مزارع فوق جمع آوری شده بود که سالمونلا تیفی موریوم فقط از یک نمونه خاک مزرعه اردک جدا شد (۲۸). نیوات و همکاران در سال ۲۰۰۰ با مطالعه بر روی اردک‌ها و جوجه ها در تایلند ۳۰ نوع سالمونلا انتریکا تحت گونه انتریکا جدا نمودند که به ترتیب شامل یک سویه از S.blockley، یک سویه از S.hadar، دو سویه از S.typhimurium، دو سویه از S.saintpaul، یک سویه S.montevideo، یک سویه از S.serftenbrg و یک سویه از S.amsterdam از اردک‌ها جداسازی شد (۲۹).

با بررسی نتایج به دست آمده و مطالعه سایر محققین به نظر می‌رسد میزان عفونت اردک و بوقلمون به سالمونلا در کشورهای مختلف متفاوت باشد. ولی در مجموع میزان عفونت سالمونلا در تخم اردک و بوقلمون نسبت به تخم ماکیان کمتر بوده و به نظر می‌رسد انتقال عمودی سالمونلا در بوقلمون و اردک کمتر از ماکیان باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر محمد حسین مرحمتی زاده ریاست دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون جهت همکاری در این پژوهش تشکر و قدر دانی می‌گردد.

References

1. Guthrie KR. Salmonella Bocan Rotan Ann. Arborlondon, 1991.
2. Zahraei – sallehi T. salmonella. Tehran University publication, 1986. (In Persian)
3. Tajbakhche H, Nazari AA. Persistence of *S. abortus ovis* in soll. Rev Med Vet pays Tvo. 1974;27:57-59.
4. Chu C, Chiu CH. Evolution of the Virulenece plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. Microbes and infection. 2006; 8:1931-1936.
5. Razavilor V. Pathogenetic microbes in foodstuffs and epidemiology of food poisoning. Tehran University Publication, second edition, 2003. (In Persian)
6. Hosseini Tabatabaei A. Herbivorous bacterial disease. Tehran University Publication, 2001. (In Persian)
7. St Louis ME, Morse DL, Potter ME, Demelifi TM, Guzewish JJ, et al. The emergence of Grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections: New implications for the control of salmonellosis. Journal of the American Medical Association. 1988; 259:2103-2107.
8. Adesiym A, Offah N, Seepersadsingh N, Rodrigo S, Lashley V, Musai L. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* Isolated from table eggs. Food Control. 2007; 18:306-311.
9. Humphrey TJ, et al. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens eggs. Epidemiology and infection. 1991; 106(3): 489- 496.
10. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Diseases of poultry .11 ed, Iowa State Press. 2003; pp:583-599.
11. De Boer E, Hahne M. Cross Contamination With *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. From raw chicken productsdu ring. Food Protection. 1990; 53:1067-1068.
12. Nunes IA, Helmuth R, Schroeter A, Mead GC, Santos MA, Solari CA. Phage typing salmonella Enteritidis from different sources in Brazil. Journal of Food Protection. 2003; 66:324-327.
13. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, et al. Evaluation. of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp ., salmonella Enteritidis and salmonella typhimurium from environmental swabs of poultry house. Letters in Applied Microbiology. 1999; 28:113-117.
14. Woodward MJ, Kirwan SES. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymenrase chain reaction. Veterinary Record. 1996; 138:411-413.
15. Adesiym A, Offah N, Seepersadsingh N, Rodrigo S, Lashley V, Musai L. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* Isolated from table eggs. Food Control. 2007; 18:306-311.
16. Cailhol J, Lailier R, Bouvet P, La Vieille S, Gauchard F, et al .Trends in antimicrobial resistance phenotypes in non-typhoid *Salmonellae* from human and poultry origins in France. Epidemiology and Infection. 2006; 134:171-178.

17. Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Lucarell S, Owczarek S, et al. Antimicrobial resistance in salmonella enterica serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Veterinary microbiology*. 2008; 128 :414-418.
18. Pan Z, WANG X, Zhang X, Geng S, Chel X, Pan W, et al. Changes in antimicrobial resistance among salmonella enterica subspecies enterica serovar pullorum isolates in China from 1962 to 2007. *Veterinary Microbiology*. 2009; 136:387-392.
19. Van Duinkerken E, Wannet WJ, Houwers DJ, Van Pelt W. Antimicrobial susceptibilities of Salmonella strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41:3574-3578.
20. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WG and Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial disease*. First published. Blackwell Science. 2002; pp:113-118.
21. Cortez AL, Carvalho AC, Ikuno AA, Burger KP, Vidal-Martins AM. Identification With *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. Isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Research in Veterinary Science*. 2006; 81:340-344.
22. Ghorbani Ranjbari A, Ghorbani Ranjbari N, Ghorbani Ranjbari Z, Asmarian SH. Study on drug resistance in salmonella spp. isolated from native eggs in Fasa. *Journal of Modern Veterinary Researches*. 2012; 4:11: 1-7.
23. Li Q, Skyberg JA, Fakhr MK, et al. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Salmonella Isolates from Processed Bison Carcasses. *American Society for Microbiology*. 2006;72(4):3046-3049.
24. Nayak R, Kenney PB, Keswani J. Isolation and characterization of salmonella in turkey production facility. *British Poultry science*. 2003;44(2):192-202.
25. David W, et al. Serotypes of Salmonella isolated from California turkey flocks and their environment in 1984-89 and comparison with human isolation. *Avian Diseases*. 1993; 37:715-719.
26. Kurtzweil Walter P. Home for the Holidays: preventing food borne illness at family Gatherings U.S. Food and Drug Administration. 2000; PP:1-4.
27. Asadi R. A survey on the Salmonella contamination of ducks eggs in Ahwaz. Professional Doctorate thesis, University of Veterinary Medicine, Shahid Chamran, Ahwaz. 2004. (In Persian)
28. You- Min FU, Ting SU, Ling-Mei Chou. Incidence of Salmonella in egg yolks of chicken, duck and processed eggs in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1993; 1(3):281-286.
29. Niwat C, Pongrama R, Aroon B, Jioj S, Stefan BS. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis for typing Avian Salmonella enterica subsp. Enterica. *Immunology and Medical Microbiology*. 2000;29:221-225.