

# 2015-2018 Yıllarında İzole Edilen *Acinetobacter* *Baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci

## Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated in 2015-2018 Years

Tuncer Özekinci\*, Zafer Habip, Neslihan Önder, Mücahide Esra Koçoğlu

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

### ÖZET

**Amaç:** *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında sık kullanılan antibiyotiklere karşı oluşan yüksek direnç oranları tedavi seçeneklerini azaltmaktadır. Çalışmada 2015-2018 yıllarında klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *A.baumannii* suşlarının antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 1 Ocak 2015-31 Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 1148 *A.baumannii* suşunun antibiyotiklere direnci retrospektif olarak incelenmiştir. Bakteri tanımlaması MALDI-TOF-MS (Biomerieux Inc., Fransa) sisteminde yapılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 (Biomerieux Inc., Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır.

**Bulgular:** Klinik örnekler içerisinde 1148 *A.baumannii* etken olarak üremiştir. İzole edilen suşlarda antibiyotiklere direnç oranları; piperasilin/tazobaktam %83.5, seftazidim %81.6, meropenem %81.7, siprofloksasin %80.5, amikasin %46.6, gentamisin %50.4, trimetoprim-sülfametaksazol %59, tigesiklin %22 ve kolistin %1.8 olarak bulunmuştur. Kolistin direnci 2015, 2016, 2017 ve 2018 yılları için sırasıyla %0.8, %0, %2.9 ve %3.2 olarak tespit edilmiştir. Tigesiklin direnci sırasıyla %23.5, %12.8, %18.9 ve %29.8 olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamızda kolistin ve tigesiklin *A.baumannii* suşlarına karşı en etkili antibiyotik olmakla birlikte, tigesiklin direncini yıllar içinde artış göstermesi ve kolistin direncinin görülmesi dikkat çekicidir. Bu artış oranları nedeniyle klinisyenler için tedavi seçenekleri her geçen gün azalmaktadır. Bu nedenle her hastanenin kendi antibiyotik direnç profilinin gözden geçirilmesinin, özellikle *Acinetobacter* enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonların ampirik tedavisinde klinisyene yol göstermesi açısından önemli olduğu düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** *A.baumannii*, antibiyotik, direnç

### ABSTRACT

**Objective:** Treatment of *Acinetobacter baumannii* infections has become increasingly difficult, due to the high resistance rates against commonly administered antibiotics. The aim of this study is to detect the antibiotic resistance of *A.baumannii* strains isolated from clinical specimens in years 2015-2018.

**Materials and Methods:** Antibiotic resistance of 1148 *A.baumannii* strains isolated from various clinical specimens between January 1, 2015 and December 31, 2018 was investigated retrospectively. Bacteria were identified using MALDI-TOF-MS (Biomerieux Inc., France) system. Antibiotic susceptibility of the strains were performed with Vitek 2 (Biomerieux Inc., France) automated system.

**Result:** In 1148 of the clinical specimens *A.baumannii* was isolated. Total antibiotic resistance of isolated strains within these four years were determined as 83.5% for piperacillin/tazobactam, 81.6% for ceftazidime, 81.7% for meropenem, 80.5% for ciprofloxacin, 46.6% for amikacin, 50.4% for gentamicin, 59% for trimethoprim-sulfamethoxazole, 22% for tigecycline and 1.8% for colistin. Colistin resistance was found to be 0.8%, 0%, 2.9% and 3.2% for 2015, 2016, 2017 and 2018, respectively. Tigecycline resistance was determined to be 23.5%, 12.8%, 18.9% and 29.8%, respectively.

**Conclusion:** In our study, colistin and tigecycline were the most effective antibiotics against *A.baumannii* strains. However, it is noteworthy that tigecycline resistance increased over the years and colistin resistance was determined. Because of these increase rates, treatment options for clinicians are decreasing day by day. Therefore, it was thought that it is important to examine its own antibiotic resistance profile by each hospital in order to guide clinician for the empirical treatment of serious infections which can be life threatening especially like *Acinetobacter* infections.

**Key Words:** *A.baumannii*, antibiotic, resistance

\*Sorumlu Yazar: Prof.Dr. Tuncer Özekinci, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D, Üsküdar/İstanbul  
E-mail: tozekinci@gmail.com, Tel: 0 (533) 369 54 11

ORCID ID: Tuncer Özekinci: 0000-0003-3475-660X, Zafer Habip: 0000-0002-9624-7790, Neslihan Önder: 0000-0001-5286-0908,  
Mücahide Esra Koçoğlu: 0000-0002-2860-1794

Geliş Tarihi: 06.12.2019, Kabul Tarihi: 23.03.2020

## Giriş

*Acinetobacter* cinsi zorunlu aerob, Gram negatif kokobasil görünümünde, oksidaz negatif, hareketsiz ve nonfermentatif bir bakteridir. *Acinetobacter*ler yara, üriner sistem, endokardit, septisemi, menenjit ve pnömoni gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (1,2).

*Acinetobacter baumannii*'ye bağlı gelişen enfeksiyonlar, bakterinin dış çevrede uzun süre canlılığını koruması, bulaşının kolay ve başta karbapenemler olmak üzere bir çok antibiyotige karşı hızlı ve çoklu ilaç direnci geliştirmelerinden dolayı önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (3,4). Son yıllarda, çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* izolatlarının artışı, antimikrobiyal ilaçların yaygın bir şekilde kullanılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (5).

Bu çalışmada hastanemizde dört yıllık süre içerisinde çeşitli örneklerden izole edilen *A.baumannii* suşlarının antibiyotik direncinin saptanması ve son yıllar içinde direnç değişikliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada 1 Ocak 2015-31 Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 1148 *A.baumannii* suşunun antibiyotiklere direnci retrospektif olarak incelenmiştir. Aynı hastanın farklı kültürlerinden üreyen izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır. Klinik örnekler klasik kültür yöntemleri ile incelenmiş, izole edilen suşların tanımlaması MALDI TOF-MS (Biomerieux Inc., Fransa) sisteminde yapılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 (Biomerieux Inc., Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır. Kolistin için 4 mg/L ve üzerindeki MİK sınır değerine sahip izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir. Antibiyotik duyarlılıkları Temmuz 2017'ye kadar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (6) sonrasında European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (7) önerileri doğrultusunda belirlenmiştir. Orta dirençli izolatlar dirençli grubuna alınmıştır. 2015-2018 yıllarında elde edilen direnç oranları karşılaştırılmasında ki kare testi kullanılmıştır.

## Bulgular

1 Ocak 2015-31 Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 1148 *A.baumannii* elde edildiği klinik örneklerin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. İzole edilen 1178 suşun antibiyotiklere direnç oranları;

piperasilin/tazobaktam %83.5, seftazidim %81.6, meropenem %81.7, siprofloksasin %80.5, amikasin %46.6, gentamisin %50.4, trimetoprim-sülfametaksazol %59, tigesiklin %22 ve kolistin %1.8 olarak bulunmuştur. İzole edilen *A.baumannii* suşlarının yıllara göre antibiyotik direnç oranları Tablo 2'de verilmiştir. Amikasin, gentamisin, tigesiklin ve kolistinde istatistiki olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir direnç artışı belirlenmiştir.

## Tartışma

*A.baumannii* cansız ve kuru yüzeylerde, sıklıkla kullanılan mekanik aletlerin yüzeylerinde, hastalarda ve personelde kolonize olarak uzun süre canlı kalabilmektedir. Bir çok antibiyotik grubuna karşı dirençli olması nedeni ile hastanelerde ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde çoklu direnç paterni gösteren enfeksiyonlara ve nazokomiyal salgınlara sıklıkla neden olabilmektedir(8). *A.baumannii* suşlarının karbapenemler, antipseudomonal penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozidler ve kinolonlar olmak üzere en az üç farklı sınıftaki antibiyotige direnç göstermesi "çoklu ilaç direnci" olarak tanımlanmakta ve bu durum tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır (9).

Şafak ve ark. (10) *A.baumannii* enfeksiyonlarını altı yıllık (2010-2016) süre boyunca değerlendirdikleri çalışmada piperasilin-tazobaktam, seftazidim, meropenem ve siprofloksasin direncini sırasıyla ortalama %92.6, %94.3, %86.3 ve %93.4 olarak bulmuşlardır. Bu direnç oranlarının yıllar içinde arttığını tespit etmişlerdir. Yıllar içinde değişkenlik göstermekle birlikte trimetoprim –sülfametoksazol direncini %88.3 gibi yüksek bir oranda saptamışlardır. Amikasin ve gentamisin direnci yıllar içinde artmakla birlikte, amikasine %63, gentamisine %69 oranında direnç saptamışlardır. Tigesikline direnci %6.1 ve kolistine direnci %3.5 olarak tespit etmişlerdir.

Eroğlu ve ark. (11) altı yıllık (2006-2011) değerlendirme yapılan başka bir çalışmada, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, meropenem ve siprofloksasin direncinin yıllar içinde artış gösterdiğini ve 2011 yılı için direnç oranlarını sırasıyla %81.1, %82.7, %77 ve %78.9 oranında tespit etmişlerdir. Gentamisine %52.6, tigesikline %5.9 ve kolistine %0.2 oranında direnç tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda, piperasilin-tazobaktama %83.5, seftazidime %81.6, meropeneme %81.7 ve siprofloksasine %80.5 direnç tespit ettik. Bu dört ilaca karşı görülen yüksek direnç oranları bu ilaçların iyi bir tedavi seçeneği olmadıklarını

**Tablo 1.** *A.baumannii* suşlarının izole edildiği örnekler

Örnek	Sayı	(%)
Kan	240	(20.9)
Trakeal aspirat	225	(19.6)
İdrar	180	(15.7)
Aspirat	164	(14.3)
Yara	158	(13.8)
Balgam	106	( 9.2)
Doku biyopsi	33	( 2.9)
Kateter	20	( 1.7)
Diğer*	22	( 1.9)
Toplam	1148	(100.0)

\*Plevral sıvı, beyin omurilik sıvısı  
BAL, Periton sıvısı

**Tablo 2.** İzole edilen *A.baumannii* suşlarının yıllara göre antibiyotik direnci [n(%)]

Antibiyotikler	2015	2016	2017	2018	Toplam
	255	282	238	373	1148
Piperasilin-Tazobaktam	222 (87.1)	230 (81.6)	206 (86.6)	301 (80.7)	959 (83.5)
Seftazidim	221 (86.7)	227 (80.5)	201 (84.5)	288 (77.2)	937 (81.6)
Meropenem	213 (83.5)	224 (79.4)	197 (82.8)	288 (77.2)	938 (81.7)
Amikasin	99 (38.8)	92 (32.6)	119 (50.0)	225 (60.3)	535 (46.6)
Gentamisin	125 (49.0)	92 (32.6)	124 (52.1)	238 (63.8)	579 (50.4)
Siprofloksasin	215 (84.3)	222 (78.7)	199 (83.6)	289 (77.4)	925 (80.5)
Trimetoprim-Sülfametoksazol	175 (68.6)	138 (48.9)	139 (58.4)	226 (60.4)	678 (59.0)
Tigesiklin	60 (23.5)	36 (12.8)	45 (18.9)	111 (29.8)	252 (22.0)
Kolistin	2 (0.8)	0	7 (2.9)	12 (3.2)	21 (1.8)

göstermektedir.

Amikasin ve gentamisin direnç oranları 2013-2019 yılları arasında ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda amikasin için %63-75, gentamisin için %69-95.8 arasında bildirilmiştir. Trimetoprim-sülfametoksazol direnci ise %66-88.3 arasında bildirilmiştir (10,12-16). Çalışmamızda 2015-2018 yılları arasında ortalama amikasin, gentamisin ve trimetoprim-sülfametoksazol direncini sırasıyla %46.6, %50.4 ve %59 olarak tespit ettik. Bu sonuçlar diğer çalışmalara göre düşük olmakla birlikte, bizim de 2018 yılı verilerimiz sırasıyla %60.3, %63.8 ve %60.6'dır. 2015 yılına göre istatistiki olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir artış olduğu görülmektedir. Aminoglikozidlere ve trimetoprim-sülfametoksazole karşı direncin yüksek oranlarda bulunması nedeniyle bu ilaçların tedavide kullanılırken dikkatli davranılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Daha önceki yıllarda toksisitesi nedeniyle kullanımdan kaldırılan kolistin direnç sorunu nedeniyle tekrar kullanıma girmiştir. Ülkemizde

kolistin direncinin saptanmadığı çalışmalar bulunmaktadır (13,17,18). Son yıllarda olmakla birlikte bu çalışmalar daha çok 2011 yılından önceki direnç oranlarını değerlendiren çalışmalardır. Bu yıllardan sonraki çalışmalarda kolistin direnci %0.2-%3.5 arasında değişen oranlarda saptanmıştır (10,11,14,16). Sadece Mansur A ve ark.(19) yaptığı çalışmada kolistin direnci %9 olarak saptanmıştır. Dede ve ark. (17) 2010-2011 yıllarını içeren ve yoğun bakım ünitelerinde izole edilen *A.baumannii* suşlarında kolistin direnci saptamamışlardır. Şahin AR ve ark (14) 2012-2017 yılları arasında yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *A.baumannii* suşlarında kolistin direncini %2.9 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda kolistin direnci 4 yıllık ortalama %1.8 olarak saptanmakla birlikte 2015, 2016, 2017 ve 2018 yılları için sırasıyla %0.8, %0, %2.9 ve %3.2 olarak saptanmıştır. Yıllar içinde direnç artışı görülmektedir. EUCAST kolistin MİK saptanmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. Ancak rutinde uygulama zorluğu

nedeniyle otomatize sistemler kullanılmaktadır. Bu nedenle sonuçların yorumlanması ve doğrulanması önemlidir (7,20). Son yıllarda kolistin için heterodirenç bildirilmeye başlanmıştır. Rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile kolistin heterodirenci tespit edilemez. Gazel D ve ark (21) ikili antibiyotik kombinasyonlarının heterodirenç oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Kolistin-rifampisin ve kolistin-tigesiklin kombinasyonlarının çok düşük dozlarda dahi bakterileri inhibe ettiğini ve direnç gelişimini önlediğini saptamışlardır. Kombine tedavi kolistin direnç sorununun aşılması için iyi bir seçenek gibi görünmektedir.

Tigesiklin direnci kolistinden daha hızlı bir şekilde artış göstermiştir. Eroğlu ve ark. (11) 2011 yılında %5.9, Cesur ve ark. (22) 2010-2012 yılları arasında %6.25 olarak bulmuşlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Coşkun S ve ark. (16) %23.9, Şahin AR ve ark. (14) %49.3, Şirin M ve ark. (23) %72.9 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda dört yılın ortalaması %22 olmakla birlikte 2018 yılı için %29.8 olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızla birlikte son yıllarda yapılan diğer çalışmalar değerlendirildiğinde piperasilin-tazobaktam, seftazidim, meropenem ve siprofloksasinin *Acinetobacter* enfeksiyonlarda iyi bir seçenek olmadığı görülmektedir. Gentamisin ve amikasin gibi aminoglikozid grubuna bağlı ilaç direnç oranları yüksek olmakla birlikte son yıllarda direnç oranlarının artmaması ve değişkenlik göstermesi dikkat çekicidir. Bu durum son yıllarda kullanım sıklığının düşmesi ile ilişkili olabilir. Son yıllarda çok ilaca dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında tigesiklin ve kolistin tek tedavi seçeneği gibi durmaktadır. Ancak tigesiklin için çok farklı direnç oranları bulunmaktadır. Bu nedenle kullanımında daha dikkatli olunmalıdır. Kolistin direncinde artış göstermesiyle *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni antibiyotiklere ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır.. Antibiyotik duyarlılık sonuçları merkezler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle her hastanenin kendi antibiyotik duyarlılık profilini belirlemesi, uygulanacak ampirik tedaviyi yönlendirmesi açısından önemlidir. Tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi yeni tedavi seçenekleri sınırlıdır. Direnç gelişimini önlemek amacıyla antimikrobiyal ajanlar antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre uygun doz ve sürelerde kullanılmalıdır. Ayrıca hastane enfeksiyonlarının önlenmesi için gerekli tedbirler alınmalı ve öncelikle *Acinetobacter* enfeksiyonu gelişimi engellenmeye çalışılmalıdır.

## Kaynaklar

1. Esen N. *Acinetobacter* ve Non-fermentatif basiller. Topcu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 4.Baskı. İstanbul:Nobel Tıp Kitabevi 2017; 1916-1924.
2. Aktaş F. Gram negatif bakterilerin hastane enfeksiyonlarındaki rolü ve epidemiyolojisi. Ulusoy S, Leblecioğlu H, Arman D(eds) *Bakteri İnfeksiyonları*. 2.Baskı. Bilimsel Tıp Yayınevi 2012; 183-206.
3. Hoban DJ, Reinert RR, Bouchillon SK, Dowzicky MJ. Global in vitro activity of comparator agents: Tigecycline evaluation and surveillance trial 2004-2013. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015; 14:27.
4. Şahin AR, Doğruer D, Nazik S ve ark. Hastane kökenli patojenlerde artan antimikrobiyal direnç sorunu: *Acinetobacter baumannii*. *Online Türk Sağ Bilim Derg* 2019; 4(2): 156-169.
5. Coelho J, Woodford N, Turton J, Livermore DM. Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat?. *J Hosp Infect* 2004; 58(3): 167-169.
6. CLSI.Clinical and Laboratory StandartsInstitute. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; twentfifth formational supplement. Document M100-S23, 2013.
7. EUCAST. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST documents version 8.1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018.
8. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *A.baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(12): 751-762.
9. Souli M, Galani I, Giamarello H. Emergence of extensively drug resistant and pandrug-resistant Gram negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13(47): 19045.
10. Şafak B, Kılınç O, Tunç N. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık oranlarının incelenmesi (2010-2016). *FLORA* 2016; 21(2): 77-81.
11. Eroğlu C, Ünal N, Karadağ A, Yılmaz H, Acuner İÇ, Günaydın M. Çeşitli klinik örneklerden 2006-2011 yılları arasında izole edilen *Acinetobacter* türleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2016; 73(1): 25-32.
12. Savcı Ü, Özveren G, Yenşehirli G, Bulut Y, Özdaş S. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının in-vitro

- duyarlılık durumları. T J Clinic Lab 2015; 6(1): 24-29.
13. Bayram Y, Gültepe B, Bektaş A, Parlak M, Güdücüoğlu H. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. *KlimikDerg* 2013; 26(2): 49-53.
  14. Şahin AR, Doğruer D, AktemurA, ve ark. Hastane kökenli patojenlerde artan antimikrobiyal direnç sorunu: *Acinetobacter baumannii*. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi* 2019; 4(2): 156-159.
  15. Alada MD, Toparlak Ü, Coşkun MV. Çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının *Acinetobacter* suşları üzerine *in vitro* etkinliğinin araştırılması. *ANKEM Derg* 2017; 31(1): 23-31.
  16. Şay Coşkun AS. Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında antibiyotik direncinin araştırılması. *ANKEM Derg* 2018; 32(2): 37-44.
  17. Dede B, Kadanalı A, Karagöz G ve ark. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik dirençlerinin araştırılması. *Bakırköy Tıp Derg* 2013; 9(1): 20-23.
  18. Telli M, Eyigör M, Korkmazgil M, Aydın N, Atalay MA. *Acinetobacter* spp. Klinik izolatlarında karbapenem direncinin moleküler epidemiyolojisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2017; 47(4): 190-196.
  19. Mansur A, Kuzucu C, Ersoy Y, Yetkin F. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde 2008 yılında yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2009; 23(4): 177-181.
  20. Girardello R, CuryAP, Franco MRG, et al. Colistinsusceptibilitytestingand Vitek-2TM: is it useless?. *Diagn MicrobiolInfect Dis* 2018; 91(4): 309-311.
  21. Gazel D, Otkun MT. Investigation of colistin heteroresistance and some factors affecting heteroresistance in carbapenem-resistant *A.baumannii* strains. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob* 2017; 6: 1
  22. Cesur M, Irmak H, Yalçın NA, ve ark. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ortadoğu Tıp Derg* 2017; 9(2): 51-55.
  23. Şirin M, Ağuş N, Yılmaz N, ve ark. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2017; 74(3): 269-278.