

عزل وتشخيص *Prototheca* من حالات التهاب الضرع في الأبقار في مدينة الموصل
سمية ياسين الدباغ

فرع الأحياء ألمجهريه، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل- العراق

(الاستلام: ١١ حزيران، ٢٠٠٧؛ القبول: ٣١ تشرين الأول، ٢٠٠٧)

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص البروتوثيكا من عينات الحليب التي جمعت من ٨٠ بقرة مصابة بالتهاب الضرع السريري و تحت السريري من مناطق مختلفة في مدينة الموصل للمدة بين تشرين الأول (٢٠٠٦) ولغاية أيار (٢٠٠٧). شخّصت البروتوثيكا بالاعتماد على الصفات الشكلية والزرعية الكيموحيوية. أظهرت الدراسة أن (١٦) عينة كانت موجبة للبروتوثيكا ونسبة ٢٠% من المجموع الكلي، تضمنت (١٤) عزلة للنوع *P. zopfii* ونسبة ١٧.٥% و عزتان للنوع *P. stagnora* ونسبة ٢.٥%. أظهرت الدراسة قابلية هذه الأحياء المجهريه لإنتاج بعض عوامل الضراوة مثل خميرة البوريز والايستريز والنسثيز واللايبيز. كما اجري فحص الحساسية تجاه بعض المضادات الحيوية وأظهرت النتائج مقاومة مطلقة للمضادات؛ *Cephalexin*, *Ampicillin*, *Amoxicillin*, *Streptomycin*, *Tetracycline*, *Neomycin*، في حين تبأنت في حساسيتها للمضادات الحيوية؛ *Nystatin*, *Gentamycin*, *Polymyxin B*.

ISOLATION AND DIAGNOSIS OF PROTOTHECA FROM BOVINE MASTITIS IN
MOSUL CITY

S. Y. AL-Dabbagh

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine,
University of Mosul. Mosul - Iraq

ABSTRACT

This study included the isolation and diagnosis of Prototheca microorganism from milk samples of 80 Cows with clinical and sub clinical mastitis from different areas in Mosul city, from October 2006 to May 2007. Prototheca were identified using morphological, cultural and biochemical characteristics. The study showed that 16 samples (20%) were positive to Prototheca from total count included 14 (17.5%) *P. zopfii* and two isolates (2.5%) *P. stagnora*. The study shows the ability of this microorganism to produce some virulence factors such as: Urease, Esterase, Lecithinase and Lipase. Results of antibiotic sensitivity test indicated that all isolates were resistant to Ampicillin, Amoxicillin, Cephalexin, Neomycin, Streptomycin and Tetracycline, while they showed different percentages of sensitivity to Gentamycin, Polymyxin B and Nystatin.

المقدمة

يعد التهاب الضرع السريري وتحت السريري أحد أهم الأمراض شيوعاً في أبقار الحليب لما يسببه من أضرار صحية للحيوان إضافة إلى تأثيره على نوعية وكمية الحليب (١). التهاب الضرع السريري يمكن ملاحظته عينا إذ يتميز الضرع بكونه متورم وصلب ويرافقه انخفاض في معدل إنتاج الحليب (٢، ٣) ويتميز الحليب بكونه مائي تخين ويحتوي على جلطات أو قشور بيضاء اللون كما تؤدي الإصابة إلى زيادة عدد الخلايا الجسمية Somatic cell count يتبعها تأثيرات سلبية تشاهد في الحالات المتقدمة والمزمنة من الإصابة (٣، ٤). أما التهاب الضرع تحت السريري فيمكن تشخيصه بالعديد من الاختبارات الكيميائية أهمها تقدير الأس الهيدروجيني، اختبار وايت سايد، اختبار كاليفورنيا إضافة إلى العد المجهرى للخلايا الجسمية (٥). يوجد ما يقارب (١٥٠) نوع من الأحياء المجهرية معروفة كمسببات لالتهاب الضرع وتضم الفيروسات، المايكوبلازما، الجراثيم، الفطريات والطحالب (٦). تعد البروتوثيكا من الطحالب الخالية من الكلوروفيل والمسببة لالتهاب الضرع وهي أحياء مجهرية وحيدة الخلية تتكاثر لاجنسبا

بالانتشار المضاعف لتنتج عدد من الخلايا البنيوية أو الأبواغ داخل حواظ سيورية (٧، ٨) تنتشر هذه الكائنات بشكل واسع بالطبيعة تم عزلها لأول مرة من قبل الباحث Lerch عام ١٩٥٢ من حالات التهاب الضرع السريري وتحت السريري (٩)، كما عزلت من مصادر مختلفة مثل النباتات، التربة، الطين، مياه الشرب للأبقار وفضلات الأبقار والخنازير (٩، ١٠). وهي لذلك تعد ممرض جيني لكرها كائنات انتهائية إذ بإمكانها ان تدخل من خلال فتحة الحلمة وتستوطن قناة الحليب وتسبب التهاب الضرع عند توفر الظروف المهيأة للإصابة وبالأخص في الحيوانات ضعيفة المقاومة (١١) كما أنها من الممكن أن تنتقل من حيوان إلى آخر أثناء عملية الحلب مما يزيد من نسبة انتشارها بين أسراد القطيع (٣).

يضم هذا الجنس عدة أنواع أهمها *Prototheca wikerhamii*, *Prototheca zopfii*,

Prototheca moriformis, *Prototheca trispora* (*Prototheca stagnora*) (١٢). وقد

زدادت أهمية هذه الأحياء المجهرية في السنوات الأخيرة كمسببات لاختلاج الغدد اللبنية في الأبقار، إذ نشرت دراسات عديدة إلى عزلها من حالات التهاب الضرع (٣، ١٢)، إذ أن هذا الكائن وسع الانتشار ومصادره متعددة ويسبب اضرار صحية للحيوان وخسائر اقتصادية في الحليب، ومنتهجانه فضلا عن مقاومته للمضادات الحيوية مما يزيد من خطورته وانتشاره (١٣، ١٤، ١٥) ليكون معظم الدراسات المحلية ركزت على المسببات الجرثومية والفطرية لحالات التهاب الضرع، لذا كان الهدف من هذه الدراسة عزل وتشخيص البروتوثيكا من حالات التهاب الضرع في الأبقار في مدينة الموصل وتحديد مدى تأثير المضادات الحيوية على العزلات المحلية.

المواد وطرائق العمل

- ١- العينات: تم جمع ٨٠ عينة حليب من أبقار مصابة بالتهاب الضرع السريري وتحت السريري للمدة من تشرين الأول ٢٠٠٦ ولغاية أيار ٢٠٠٧ إذ أملت النفعات الأوسى من الحليب وأخذ حوالي (٢٠) مل من الحليب وضعت في قناني معقمة نقلت بعدها في حاويات مبردة إلى مختبر الأحياء المجهرية لغرض إجراء الفحوصات المختبرية عليها.
- ٢- الاختبارات التأكيدية: اجري اختبار وايت سايد White - Side test على عينات الحليب المأخوذة من حالات التهاب الضرع الواضحة سريريا والعينات لالتهاب الضرع تحت السريري وذلك لغرض التأكد من وجود الإصابة (٥).
- ٣- الأوساط الزرععية: استخدمت الأوساط الزرععية التالية والمنتجة من شركة Oxiod الانكليزية وقد حضرت حسب تعليمات الشركة المنتجة. أكار السدم؛ أكار السابروود؛ دكستروز؛ أكار الماكونكي؛ أكار مولر هنتون؛ العرق المغذي.
- ٤- الأوساط الزرععية المستخدمة في الكشف عن عوامل الضراوة: أكار ليوريا؛ وسط إنتاج خميرة الايستريز؛ وسط إنتاج خميرتي الليثييز و اللابيز (١٦).
- ٥- زرع العينات: لقت عينات الحليب بعد رج القنينة بهدوء على كل من وسط أكار السابروود دكستروز الخالي من السايكلوهكسامايد والمضاف له مادة الثايمين وحضنت الأطباق بدرجة ٢٨ - ٣٠ م° لمدة ٤٨ ساعة ، وسط أكار السدم ، وسط الماكونكي وحضنت الأطباق بدرجة ٣٧ م° لمدة ٤٨ ساعة ولوحظ لون المستعمرات وحجمها وشكلها وقوامها (١٧).

٦- للفحوصات المجهرية: لدراسة الشكل والترتيب والتفاعل الصبغوي وملاحظ الحوائظ السبورية والمحفظة تم اجراء الفحوصات المجهرية على العزلات والتي تضمنت صبغة كرام ، صبغة اللاكتوفينول القطنية الزرقاء، صبغة المثيلين الزرقاء وصبغة الحبر الهندي (١٨ ، ١٩).

٧- الفحوصات الكيموحيوية: تضمنت الفحوصات الكيموحيوية اجراء اختبار تخمر الكربوهيدرات والتي شملت سكر الكلوكوز، الكلاكتوز، اللاكتوز، السكاروز، التريبالوز، الارابينوز، المالتوز، الكليمسول، ن- بروبانول (٩ ، ١٨). كما تم الكشف عن بعض عوامل الضراوة للبروتوثيكا وذلك باجراء اختبار إنتاج خميرة اليوريز واختبار انتاج خميرة الايستريز واختبار انتاج خميرتي السثينيز واللايبيز (١٧).

٨- اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية: اجري اختبار فحص الحساسية حسب ما جاء في نشرة منظمة الصحة العالمية بطريقة الانتشار بالأقراص المحورة (٢٠). وذلك بتلقيح العتر المدروسة في المرق المغذي لمدة (٤) ساعات ثم نشر معلق خلايا على أكار مولر - هنتون باستخدام بمسحة قطنية معقمة وتركت الأطباق لمدة (١٠) دقائق بدرجة حرارة الغرفة لكي تنتشر . وضعت أقراص المضادات الحيوية وحصلت الأطباق بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ثم قيست مناطق تثبيط النمو وقورت بالمعادلات القياسية . تم استخدام (٩) مضادات حيوية مجيزة من شركة Oxiod بتركيز قياسية: Amoxicillia (AML 50µg); Ampicillin (AM 10µg); Cephalexin (KXc 75µg); Gentamycin (CN 10µg); Neomycin (NE 30µg); Nystatin (NS 100 I.U.); Polymyxin B (PB 300 I.U.); Streptomycin (S 10µg); Tetracycline (TE 30µg);

النتائج

من خلال فحص 80 عينة حليب لأبقار مصابة بالتهاب الضرع السريري ونحت أسري تم

الحصول على 16 عزلة من البروتوثيكا والتي شكلت 20% من المجموع الكلي للعينات وكما مبين

في الجدول (1).

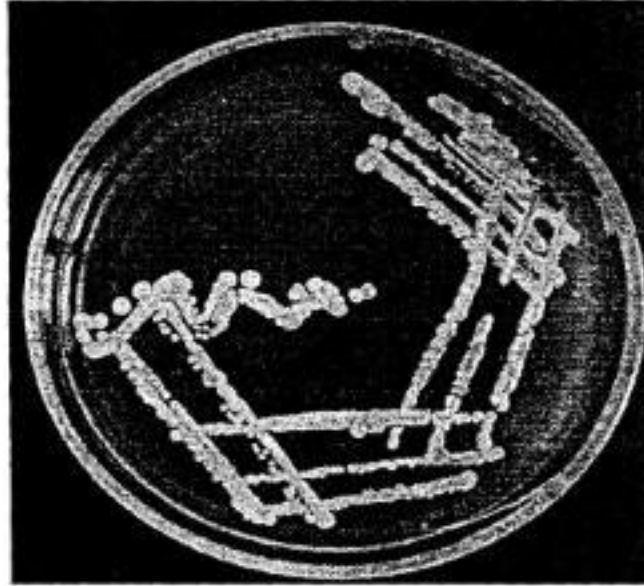
جدول 1: أنواع البروتوثيكا المعزولة من حالات التهاب الضرع في الأبقار وأعدادها ونسبها المئوية .

النسبة المئوية	العدد	نوع البروتوثيكا
17.5	14	<i>Prototheca zopfii</i>
2.5	2	<i>Prototheca stagnora</i>

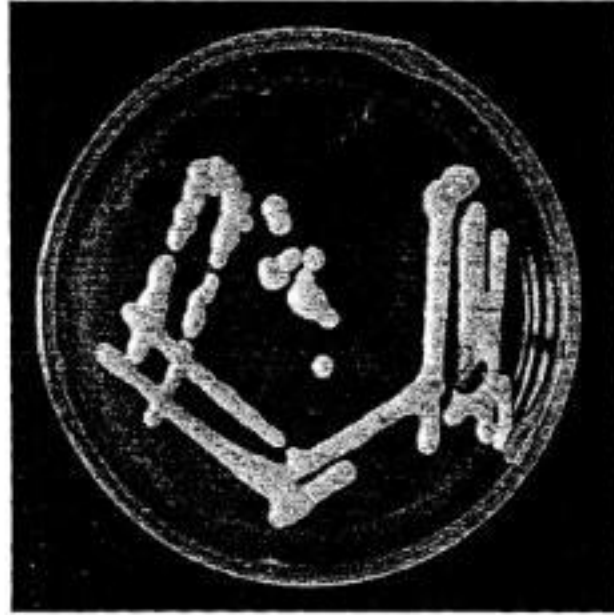
الصفات المزرية: أظهرت الفحوصات الزرعية للعزلات نموها على وسط أكار الدم في
 ظهرت المستعمرات بيضاء الى رمادية صغيرة غير محطلة للدم وذلك بعد تحضيرها لمدة 48 ساعة
 بدرجة حرارة 37° م وعلى وسط أكار السابروود نكستروز الخالي من السايكلوهكساميد والاضاف له
 مادة الثايمين فقد ظهرت مستعمرات *P.zopfii* بعد 48 ساعة بدرجة 28 - 30° م بيضاء كريمية
 ذات سطح حبيبي شبيهة بالخمائر وكما مبين في صورة (1) أما مستعمرات النوع *P. stagnora* فقد
 ظهرت بيضاء اللون، ملساء، لزجة لكونها تحوي على المحفظة صورة (2). أما على وسط أكار
 الماكونكي ظهرت المستعمرات صغيرة شاحبة غير مخمرة لسكر اللاكتوز.

الفحوصات ألمجيرية: تم دراسة الشكل المجيري لهذه الكائنات باستعمال صبغة كرام فقد
 ظهرت خلايا البروتوثيكا موجبة لصبغة كرام دائرية الى بيضوية. وعند استعمال صبغة اللاكتوفينول

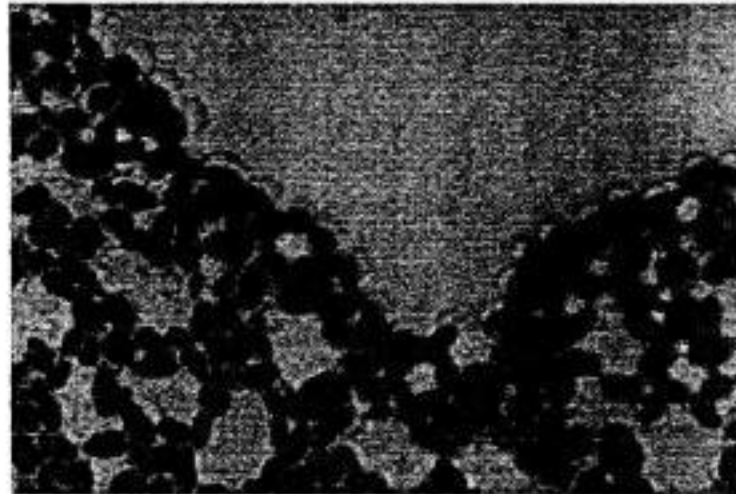
القطنية للزرقاء وصبغة المثيلين الزرقاء فقد ظهرت الخلايا بيضوية يتراوح قطرها بين ١٠-25 مايكرون وهذه تمثل الحواظ السبورية واحتوى بعضها على الابواغ الداخلية ، محاولة بتطبيق هلامية شفافة (صورة ٣). وعند استخدام صيغة الحبر الهندي فقد اظهر النوع *Prototheca stagnora* امتلاكه للمحفظة وهي صفة تشخيصية مميزة لهذا النوع (صورة 4).



صورة (١) : مستعمرات *Prototheca zopfii* على وسط أكار سايرود دكستر وز



صورة (٢): مستعمرات *Prototheca stagnora* على وسط أكلر سايرود
ديكستروز



صورة (٣): خلايا *Prototheca spp.* بصيغة المتلئين الأزرق



صورة (٤): المحفظة لخلايا *Prototheca stagnora* بصبغة الحبر الهندي

اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية؛ اجري اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية للعضلات تجاه عدد من المضادات الحيوية إذ ظهرت معظم العزلات مقارسة تجسأه الامبيسلين، الاموكسايين، السيفالكسين، التتراساكلين، النيومايسين، الستريترمايسين بينما أدت بعض العزلات حساسية للجنتمايسين والبوليميكسين ولمضاد الفطريات الستاتين وكما مبين في جدول ٣.

الاختبارات التشخيصية الكيموحيوية: بينت الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية لعزلات

البروتوثيكا نتائج موجبة وسالبة ومتغايرة كما في الجدول (٢).

جدول ٢: الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية لعزلات البروتوثيكا

نوع الميكروب		اسم الاختبار
<i>P. stagnora</i>	<i>P. zopfii</i>	
-	+	اختبار اليوريز
-	+	اختبار الأستريز
-	+	اختبار الأستنيز
-	+	اختبار اللايبيز
		تخمير الكربوهيدرات
-	+	كلوكوز
-	-	لاكتوز
-	V	كلاكتوز
-	-	تريهالوز
+	-	سكروز
-	-	مالتوز
-	-	ارابينوز
-	+	كليسرول
-	V	ن-بروبانول

+ نتيجة موجبة؛ - نتيجة سالبة؛ V نتيجة سلبية؛ - نتيجة سلبية

جدول ٢: حساسية ومقاومة البروتوثيكا المعزولة للمضادات الحيوية المستخدمة

TE		S		PB		NS		NE		KXC		CN		AMP		AML		العدد	نوع الميكروب
R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S		
1	0	1	0	1	6	3	7	1	0	1	0	6	2	1	0	1	0	14	<i>P.zopfli</i>
4		2						4		4				4		4		*	
2	0	1	0	1	1	1	1	2	0	2	0	1	1	2	0	2	0	2	<i>P.stagnora</i>

* باقي العزلات أبدت حساسية متوسطة Intermediate للمضادات المستخدمة في الدراسة .

المناقشة

أظهرت نتائج العزل الميكروبي لعينات الحليب المأخوذة من حالات التهاب الضرع السريري وتحت السريري وجود ١٦ عزلة لجنس البروتوثيكا والتي شكلت 20% من المجموع الكلي للعينات وقد جاءت هذه النتيجة مقارنة للنسبة المسجلة من قبل (٢١) إذ سجل نسبة عزل (٢٥%) بينما كانت بقية العينات سالبة العزل لجنس البروتوثيكا ويعزى ذلك لوجود مسببات أخرى لالتهاب الضرع كالجراثيم وخاصة (المكورات العنقودية ، المكورات السبجية، التوتديات التقيحية) وفيروسات والفطريات كما أشار إليها العديد من الباحثين (٢٢، ٢٣، ٢٤).

شكل النوع *Prototheca zopfli* النسبة الأكبر ١٧,٥% للعزل وهذا يتفق مع ما أشار إليه الباحثان في البرازيل (١٥ ، ٢٥) وذلك لكونها تملك العديد من عوامل الضراوة كإنزيم الـسوريز، الـايستريز، الـلستينيز والـلايبيز والتي تمكنها من إحداث المرض وخاصة في الحيوانات ضعيفة المقاومة أو التي تم علاجها بالمضادات الحيوية لفترة طويلة وقد اختلفت هذه النسبة عن النسب المسجلة من قبل (١٢، ١٧، ١٨) إذ بلغت ٣,٣%، ٤%، ٣٠,١% على التوالي، ويعزى هذا التباين في النسب إلى اختلاف عدد العينات أو إلى الاختلاف بالموقع الجغرافي والمناخ إذ تزداد نسبة عزل

البروتوثيكا في أشهر السنة الممطرة الدافئة، فضلا عن طبيعة المجتمع الميكروبي في البيئة المحيطة (٣، ٩). بينما سجل النوع *Prototheca stagnora* نسبة ٢,٥% وقد تزامن وجودها في عينات الحليب مع جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus* وهي بذلك لا تعد مسببا رئيسيا لالتهاب الضرع وهذا يتفق مع ما أشار إليه (٨) بأن وجودها في عينات الحليب بعد تولد بيتنا إذ أنها موجودة بصورة طبيعية في براز الأبقار وبإمكانها أن تنتقل إلى الضرع عند عدم الاعتناء بنظامية الحيوان وحظائره وعدم مراعاة الحلابين لشروط الحلب الصحيحة (٣، ١٠).

أظهرت نتائج الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية قابلية *P. zopfii* على استهلاك تكليسول والكلوكوز و ن-بروبانول بعد ١٥ يوم من التحضين وعدم قابليتها لاستهلاك سكر اللاكتوز، الكالاكتوز، الارابينوز، التريبالوز، المالتوز، السكروز. أما *P. stagnora*، فأظهرت قدرتها على تخمير السكروز بعد ١٥ يوم وعدم قدرتها على استهلاك السكريات الأخرى وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ما أشار إليه (٩، ١٤). إذ أن قابلية البروتوثيكا لاستهلاك الكربوهيدرات تعد من الصفات التشخيصية المهمة (٢٥، ٢٦). أظهرت نتائج اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية مقاومة البروتوثيكا المطلقة لكل من الامبيسلين، الاموكسيلين، السيفالكسين، النيومايسين، انتراساكلين، والستريتومايسين وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ما أشار إليه كل من (١٣، ١٨) وتعدى صفة المقاومة إلى استخدام المضادات الحيوية لفترة طويلة للأغراض العلاجية أو كإضافات علفية وهذا الاستخدام بإمكانه أن ينتج نبيئا اختياريا مقاوما لمضادات معينة والذي بدوره يقوم بنقل باثرميدات المقاومة بين انواع الجنس وأن امتلاكها لصفة المقاومة لمضادات الجراثيم ومعظم مضادات الفطريات شكل معضلة حقيقية في إمكانية السيطرة عليها والحد من انتشارها لكونها لا تستجيب للعلاج بالمضادات الحيوية المتوفرة (١٤). وقد تبينت في حساسيتها للجنتمايسين والبوليميكسين والمضاد

الفطري للنستاتين ونسب 28,5%، 42,8%، و 28,3% على التوالي وجاءت هذه النسب مقاربة للنسب المسجلة من قبل (15) إذ سجل نسبة حساسية 37,5% للجنتاميسين و 43,8% فانوليميكسين لكن اختلفت عنه بالنسبة للنستاتين إذ سجل نسبة حساسية 100%. بينما سجل (17) نسبة حساسية 58,3% للجنتاميسين و 21,4% للنستاتين.

المصادر

1. Bergonier D, Cremoux R, Rupp R, Lagrifoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res 2003; 34: 689 – 716.
2. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Text Book of Veterinary Medicine. 9th ed., W.B. Saunders Company, London. 2002; Pp: 659.
3. Gonzalez RN. Prototheca, Yeast and Bacillus as a cause of Mastitis. Published in the National Mastitis Council Annual Meeting Proceeding 1999; 82.
4. BiBerstein EL, Zee YC. Veterinary Microbiology. Black Well, Boston 1990; 343–344.
5. Coles EH. Veterinary Clinical Pathology. W. B. Saunders Company, London, 1980; 428 – 438.
5. Nelson PW, Stephen NG. Wining the fight against mastitis Westphalia surges Inc., U S A, 2003; 1 – 33.
7. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology . 15th ed., 2002; 575.
8. Songer JG, Post KW. Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Elsevier Saunders 2005; 408 – 409.
9. Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. Lea & Febiger, London 1992; 785 – 794.
10. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. 15th ed. Mosby, Elsevier Limited, London 2004; 343–344.
11. Carter GR, Wise D J. Essentials of Veterinary: Bacteriology and Mycology 6th Ed Iowa State Pres 2004; 241.
12. Ognean L, Pusta D, Oana L. Signals regarding the isolation of chlorophyll Free – Algae in the milk of some healthy cows and some with mastitis, J Central Euro Agriculture 2001; 2: 29 – 32.

13. Costa E O, Ribeiro AR, Melvillo PA, Prada M S, Carciof AC, Watanabe J T. Bovine Mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathologia J A* 2004; 133: 85 – 88.
14. Dion WN. Bovine Mastitis due to *Prototheca zopfii* II. *Vet J* 1979; 20: 221 – 222
15. Vargas AC, Lazzari A, Santurio JM, Alves SH, Ferreira G, Kreutz LC. Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. *Mycopathologia* 1998; 142: 135–137.
16. Collee JG, Marmion BP, Fraser AC, Simmons A. Mackie, McCartney Practical Microbiology. 14th ed. Churchill Livingstone New York 1996; PP: 245 – 258.
17. Mainowski E, Lassa H, Klossowska A. Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed Secretion of Udders. *Bull Vet Inst Pulway* 2002; 46: 295 – 299.
18. Dobrvaška M, Ljiljana S, Pusic I, Branka V, Vukosava DM. Outbreak of endemic of protothecal mastitis on A Dairy farm. *Acta Veterinaria Beograd* 2006; 56: 259 – 261.
19. Canargo ZP, Fischman O. *Prototheca stagnora*. An Encapsulated Organism. *Sabouraudia* 1979; 17: 197- 200.
20. Vandepitte J, Engback K, Piot P, Hench CC. Basic Laboratory Procedures in clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva, Switzerland 1991; 31 – 95.
21. Frank N. *Prototheca* a cause of bovine mastitis. *Am J Vet Rec* 1989; 30: 1785–1790.
٢٢. الجوالي، الهام عبد الغني قاسم ، العلاقة بين الجرثائم المسببة لالتهاب الرحم والضرع في الأبقار . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل . ١٩٩٦ .
٢٣. محمود، ابتهاج نوفل. دراسة جرثيم المكورات العنقودية غير المنتجة لخميرة التجلط (CNS) – Coagulase Negative Staphylococci من حالات التهاب الضرع تحت السريري في الأبقار . رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل، ٢٠٠٦ .
٢٤. الشكرجي، باسم يحيى ، عزل وتشخيص الفطريات المرضية من حالات التهاب الضرع في الأبقار ، المؤتمر العلمي الرابع ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل، ٢٠٠٦ .
25. Roesler U, Hensel A. Longitudinal Analysis of *Prototheca zopfii* Specific Immune Responses: Correlation with Disease Progression and Carriage in Dairy Cows. *Int J C M* 2003; 41: 1181–1186.
26. Firsh DC, Zee YC. *Veterinary Microbiology: black well Science* 1999; pp: 270.