

## Seroprevalence of Paratuberculosis in Cattle in Ardahan Region

Mesut KARATAY<sup>1</sup>, Enes AKYÜZ\*<sup>1</sup>, Gürbüz GÖKÇE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Kars, Turkey

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the prevalence of paratuberculosis the dairy cattle of Ardahan province. 11 focuses randomly selected from the Ardahan center and its districts and a total of 400 cattle blood sera from 22 farms in these centers constituted the study material. In the study, commercial ELISA antibody test kit was used to investigate "Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis" (MAP) antibodies in cattle blood serum samples. As a result of the analysis, 17 of 400 animals were positive for MAP and prevalence in Ardahan province and its vicinity was determined as 4.25% (17/400). Paratuberculosis was detected in 9 of 22 farms sampled. This result has been predicted that pTB is subclinical in dairy cattle in Ardahan region and may cause economic losses. Considering that this disease is zoonotic, it can be said that public health may also be affected. Therefore, it will be beneficial to carry out more studies on pTB.

**Keywords:** Cattle, Johne's Disease, Paratuberculosis, Seroprevalence

\*\*\*

### Ardahan Yöresindeki Sığırlarda Paratüberküloz'un Seroprevalansı

#### ÖZ

Bu çalışmada Ardahan yöresindeki süt sığırlarında paratüberküloz'un (pTB) prevalansının belirlenmesi amaçlandı. Ardahan merkez ve ilçelerinden rastgele seçilen 11 odak ve bu odaklardaki 22 işletmeden alınan toplam 400 sığır kan serumu çalışmanın materyalini oluşturdu. Çalışmada, sığır kan serum örneklerinde "Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis" (MAP) antikorlarının araştırılması amacıyla ticari Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) antikor test kiti kullanıldı. Analiz sonucunda 400 hayvandan 17'sinde MAP yönünden pozitiflik belirlendi. Ardahan ili ve çevresindeki yaygınlık oranı %4,25 (17/400) olarak tespit edildi. Örnek alınan toplam 22 çiftliğin 9'unda paratüberküloz'un varlığı tespit edildi. Bu sonuçla, Ardahan yöresindeki süt sığırlarında pTB'un subklinik olarak bulunduğu ve ekonomik kayıplara yol açabileceği öngörülmüştür. Bu hastalığın zoonotik olduğu düşünüldüğünde halk sağlığının da etkilenebileceği söylenebilir. Bu nedenle pTB ile ilgili daha fazla çalışma yapılması faydalı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Johne's Hastalığı, Paratüberküloz, Seroprevalans, Sığır

To cite this article: Karatay M, Akşüz E, Gökçe G. Seroprevalence of Paratuberculosis in Cattle in Ardahan Region. Kocatepe Vet J. (2020) 13(4): 327-331.

Submission: 22.05.2020 Accepted: 10.09.2020 Published Online: 05.11.2020

ORCID ID; MK: 0000-0001-7036-9100, EA: 0000-0002-3288-2058, GG: 0000-0002-2492-5193

\*Corresponding author e-mail: enesakyuz\_44@hotmail.com

Paratüberküloz Norveç, İsveç ve Avustralya'daki bazı bölgeler hariç dünyanın birçok ülkesinde görülen yaygın bir hastalıktır. Paratüberkülozis ya da diğer ismi olan Johne's hastalığı "*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*" (MAP)'in neden olduğu kronik, granülatöz enteritis ile karakterize, hayvanların et ve süt veriminin azalmasını yanında, reproduktif verimin önemli bir şekilde düşmesine ve büyük ekonomik kayıplara neden olan oldukça bulaşıcı bir enfeksiyondur (Gilarioni ve ark. 2012, Makav ve ark. 2013, Lingling Li ve ark. 2017, William ve ark. 2018). Etken ilk olarak Alman bilim adamları Johne ve Frothingham tarafından 1895'de izole edilmiştir. Son yıllarda yapılan fenotipik ve genotipik çalışmalar sonucunda tespit edilen etkenin *Mycobacterium avium*'a çok yakın olduğu ortaya konulduğundan ayrı bir tür olarak değil *M. avium*'un bir alt türü olması ve adının "*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*" olması gerektiği ileri sürülmüştür (Hurley ve ark. 1988, Thorel ve ark. 1990, Johne ve ark. 1895, Collins ve ark. 2003, Abendan ve ark. 2013). Hastalık 2-6 yaş ergin ineklerde kendini gösterir. Fakat etken buzağuların ilk aylarında hayvanları enfekte edebilir (Civelek 2018). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'in konakçı yaygınlığı oldukça geniştir. Genellikle süt sığırlarında karşılaşılan bir etken olarak görülmektedir. Fakat deve, manda ve muflonlarda da paratüberküloz tespit edilmiştir. Aynı zamanda bazı hayvan türlerinde de (tavşan, ayı, tilki, rat, fare, yaban domuzu ve kuşlar) paratüberküloz tespit edilmiştir (Selbitz 2002, Machackova ve ark. 2004, Alvarez ve ark. 2005, Florou ve ark. 2005, Judge ve ark. 2005, Sivakumar ve ark. 2005). Hastalığın ortaya çıkışını hızlandıran hayvanın doğum yapması, nakiller, beslenme yetersizlikleri ve fazlalıkları, yüksek süt verimi, paraziter enfestasyonlar ve aynı zamanda ortaya çıkan başka hastalıklar, nemli ya da mineral bakımından yetersiz meralarda otlatma gibi predispoze nedenlerdir (Baumgartner ve ark. 2006). Paratüberküloz'un teşhisinde, kesin bir tanı yöntemi bulunmamakla birlikte kan testleri, kültür ve mikroskopik muayene yöntemleri kullanılmaktadır. Rektum mukozası kazıntısı ve gaitadan alınan örneğin Ziehl-Neelsen tekniği ile boyanması, pTB basillerinin tespit edilmesinde en basit yöntemdir (Yazıcıoğlu 2011). Ayrıca ELISA subklinik enfekte hayvanların tespitinde, diğer testlere göre en güvenilir metot olduğu bildirilmiştir (Stricklands ve ark. 2005). ELISA, MAP'a karşı oluşan antikorların belirlenmesini sağlar. Günümüzde bu hastalığın tanısında en yaygın kullanılan metottur (Kalis ve ark., 1999; Jubb ve ark., 2004; Yıldırım ve Civelek, 2013).

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınan onay (KAÜ-HADYEK 2016-126) sonrası yürütülmüştür. Sunulan çalışmada Ardahan ili merkezi ve ilçelerinden rastgele seçilen 11 odak belirlendi ve bu belirlenen odaklardan 22 işletmede bulunan klinik muayene sonucunda sağlıklı olan 2 yaş ve üzerinde toplam 400 sığır kan serumu çalışmanın materyalini oluşturdu. *Vena coccygea*'dan 10 mL antikoagülsüz tüplere (Hemelab) kan örneği alındı. Kan örnekleri alındıktan sonra Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarında 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen serum örnekleri mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve etiketlenerek ölçüm yapıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. Çalışmada sığır kan serum örneklerinde MAP antikorlarının araştırılması amacıyla ticari ELISA antikor test kiti kullanıldı (*Mycobacterium paratuberculosis* Antibody Test Kit, 06-07130-26, IDEXX). Serum örnekleri ve test kontrollerine ait değerler excel dosyasına aktarılarak, testin validitesi, ilgili hesaplamalar ve sonuçların yorumlanması üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

#### İstatistiksel Değerlendirme

ELISA sonuçlarına ait pozitif ve negatif veriler Microsoft Office Excel programı kullanılarak % olarak hesaplandı.

#### BULGULAR

Analiz sonucunda 400 hayvandan 17'sinde MAP yönünden pozitiflik tespit edildi ve Ardahan ili ve çevresindeki yaygınlık oranı %4,25 (17/400) olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.

Paratüberküloz açısından pozitif bulunan vakaların odak/köy ve işletmelere göre dağılımı Tablo 2'de sunulmuştur. Örnek alınan toplam 22 işletmenin 9'unda paratüberküloz varlığı tespit edildi. Paratüberküloz pozitif 17 vakanın ırk olarak dağılımı; 12 simental veya melezi ve 5 montofon veya melezi olarak tespit edildi (Tablo 3). Buna göre pozitif vakaların paratüberküloz oranı simental veya melezlerinde %70,58 (12/17), montofon veya melezlerinde %29,42 (5/17) olarak gerçekleşti. Paratüberküloz pozitif vakaların yaşa göre dağılımı Tablo 4'te sunulmuştur. Pozitif 17 vakanın yaşa göre dağılımı; pozitif vakanın 12'si 2 yaşında veya 2 yaş ile 6 yaş arasında, 1'i 6 yaşında veya 6 ile 8 yaş arasında ve 4'ü 8 yaşında veya 8 yaşından büyük olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 1:** Ardahan yöresinde paratüberküloz seroprevalansı.  
**Table 1:** Paratuberculosis seroprevalence in Ardahan region.

	Hayvan Sayısı	Yüzdesi (%)
Pozitif (+)	17	4,25
Negatif (-)	383	95,75
Toplam	400	100

**Tablo 2:** Seropozitif hayvanların işletmelere göre yaygınlık oranı.  
**Table 2:** Prevalence rate of seropositive animals by enterprises.

Odak/Yerleşim	İşletme Kodu	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı
Ardahan/Beşiktaş Köyü	1	29	0
	2	31	0
Göle/Sürügüden Köyü	10	25	5
	3	49	0
Göle/Yanatlı Köyü	19	40	0
	11	7	1
Göle/Mollohasan Köyü	20	23	0
Göle/Tahtakıran Köyü	9	12	0
Göle/Okçu Köyü	21	7	1
Göle/Merkez	22	10	0
	12	15	4
	13	23	1
Damal	14	18	0
	15	14	2
	16	12	1
Posof/Çamyazı Köyü	17	12	1
	18	19	1
	4	22	0
Çıldır/Göleben Köyü	6	10	0
	8	6	0
Çıldır/Gölebakan Köyü	7	5	0
	5	11	0
Toplam	22	400	17

**Tablo 3:** Seropozitif hayvanların ırklara göre dağılımı.  
**Table 3:** Distribution of seropositive animals by race.

İrk	Hayvan sayısı	Pozitif Hayvan sayısı	Pozitif Hayvan Yüzdesi
Simental veya melezi	150	12	%70,58
Montofon veya melezi	150	5	%29,42
Yerli ırk veya melezi	50	0	0
Toplam	400	17	100

**Tablo 4:** Seropozitif hayvanların yaşa göre dağılımı.  
**Table 4:** Distribution of seropositive animals by age.

Hayvanın yaşı	Hayvan sayısı	Pozitif hayvan sayısı	Pozitif Hayvan Yüzdesi
≥2 - <6	252	12	70,59
≥6- <8	45	1	5,89
≥8	103	4	23,52
Toplam	400	17	100

## TARTIŞMA

Dünyada paratüberküloz'un prevalansı ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu durum dünyanın diğer yerlerinde de paratüberküloz'un önemli olduğu ve hala sorun oluşturduğunu göstermektedir. Genel olarak, Avrupa ülkelerindeki yaygınlığının %0 ile %19,8 arasında değiştiği belirlenmiştir (Nielsen ve ark. 2009). Ardahan yöresinde de prevalans oranı (%4,25) bu aralık içerisindeydi. Paratüberküloz'un prevalansının, yapılan çalışmalara göre ülkeden ülkeye hatta kıtadan kıtaya değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Bu durum kullanılan tanı yöntemlerinin farklılığı, ülkeden ülkeye göre yetiştirici bilincinin farklılığı, yetiştirilen toprakların asit ve alkali farkı, bakım ve hijyen farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünüldü. İç Anadolu'da yapılan bir çalışmada paratüberküloz'un seroprevalansı %2,7 olarak saptanmıştır (Vural ve ark. 1988). Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda; Elazığ Bölgesinde %3,4 ile %5 (Çetinkaya ve ark. 2000) ve Uşak Bölgesinde %2,5 ile %20 (Yıldırım ve ark. 2013) arasında değiştiği, ayrıca Trakya bölgesinde %0 (Ikız ve ark. 2005) ve Burdur Bölgesinde %6,2 (Öztürk ve ark. 2010) olarak bulunmuştur. Makav ve ark. (2013), yaptıkları bir çalışmada paratüberküloz'un seroprevalansını Kars yöresinde ELISA yöntemiyle %3,5 olarak bulmuşlardır. Sunulan bu çalışmada da Ardahan yöresinde ELISA yöntemiyle seroprevalans %4,25 olarak bulundu. Sunulan çalışmadaki bu oran İç Anadolu, Elazığ ve Kars yöresinde yapılan çalışmalara yakın bulunmuştur. Paratüberküloz sığırlarda kronik ishal ve verim kayıplarına yol açan, MAP'ın neden olduğu bakteriyel bir hastalıktır. İşletme bazında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Paratüberküloz'da kandaki antikor seviyesi hastalığın şiddeti ve yaşla artmaktadır. O nedenle 2 yaşın altındaki hayvanlarda güç teşhis edileceği bildirilmiştir (Whittington ve ark. 2001). Sunulan bu çalışmada da 2 yaşın üstündeki hayvanlarda kan örnekleri alınarak ELISA yöntemiyle MAP antikorları araştırılmıştır. Çünkü daha önceden yapılan çalışmalar da 2 yaşın altında seroprevalansın düşük olduğu 2 yaşın üzerinde yüksek olduğu bildirilmiştir (Whittington ve ark. 2001, Sweeney ve ark. 2011). Yapılan bir çalışmada Burdur yöresinde hastalığın en yüksek yaygınlık oranını ise 3 yaşındaki sığırlarda %19,7 belirlemişlerdir (Öztürk ve ark. 2010). Kars yöresinde yapılan bir çalışmada Paratüberküloz'un en yüksek yaygınlık oranının yaşı 7 ve/veya 7 üzeri olarak gruplandırılan sığırlarda %5,1 olduğu belirlenmiştir (Makav ve ark. 2013). Sunulan çalışmada ise paratüberküloz açısından 2-6 yaşları arasında sığırlarda en yüksek oranda seropozitiflik (%4,7) bulunmuştur. Bu yaş aralığında seropozitifliğin daha yüksek olmasının nedeni, numune alınan sığırların büyük çoğunluğunun 2-6 yaş aralığında olması, daha ileri yaşlı numune sayısının az olması neticesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Sunulan çalışma ve belirtilen çalışmaların en yüksek seropozitiflik yaşı 2 ve üzerinde olmasıyla birbirleriyle

benzerlik göstermiş, ayrıca literatür bilgilerle uyumlu bulunmuştur (Whittington ve ark. 2001, Sweeney ve ark. 2011).

Burdur yöresinde pTB'nin prevalansı Holştayn ırkı sığırlarda %6,2 olarak belirlenmiştir (Öztürk ve ark. 2010). Kars yöresinde yapılan bir çalışmada ise üç ayrı ırkta yaygınlık oranları değerlendirildiğinde pozitif vakaların %35,7'si simental ve melezi, %50'si montofon ve melezi ve %14,3'ü yerli ırk ve melezi olarak tespit edildi (Makav ve ark. 2013). Bu çalışmada ise pozitif vakaların oranları simental ve simental melezlerinde %70,58 ve montofon veya melezlerinde %29,42 oranında bulundu. Yerli ırklarda herhangi bir pozitifliğe rastlanmadı. Sunulan çalışmanın sonuçları ile yapılan çalışmaların kültür ırklarında oranın yüksek olmasıyla benzerlik göstermiştir. Bu durum kültür ırklarının hastalığa yerli ırklara göre daha duyarlı olabileceğini göstermektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak Ardahan yöresindeki süt sığırlarında pTB nin seroprevalansı %4,25 olarak bulundu. Bu sonuç Ardahan yöresindeki sığırlarda pTB'un subklinik olarak bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum hastalığa karşı ülkemizde olduğu gibi Ardahan yöresinde de bu hastalığa karşı kontrol önlemlerinin alınması gerektiğinin göstergesi olabilir. Sunulan bu çalışma da pTB hastalığının kültür ırkı sığırlarda daha yaygın olduğunu, dolayısıyla kültür ırklarının daha duyarlı olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu hastalığın zoonotik olduğu düşünüldüğünde halk sağlığının da etkilenebileceği söylenebilir. Bu nedenle pTB ile ilgili daha fazla çalışma gerçekleştirilmesi fayda sağlayacaktır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Abendan N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.** Mycobacterium aviumsubspeciesparatuberculosis isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle,bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Vet Microbiol.* 2013; 163:325-334.
- Alvarez J, De Juan L, Aranaz A.** A survey on paratuberculosis in wildlife in Spain. In:8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, 2005.
- Baumgartner W. ve Khol JL.** Paratuberculosis (Johnes Disease) in ruminants -an ongoing story, *Slov Vet Res.* 2006; 43(1):5-10.
- Civelek T.** Paratüberküloz 'sığırlarda paratüberküloz'. <http://www.turancivelek.net/FileUpload/ks117047/File/ptb.pdf>. Erişim tarihi: 14.02.2018.
- Collins M. and Manning E.** "Johnes Information Center" The University of Wisconsin-School of Veterinary Medicine, 13 March 2003.

- Çetinkaya B, Muz A, Ertaş HB, Öngör H, Sezen İY, Gülcü HB.** Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Türk J Vet Anim Sci.* 2000; 24:371-379.
- Florou M, Leontides L, Billinis C.** Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife in Greece. In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, 2005.
- Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL.** Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev Argent Microbiol.* 2012; 44:201-215.
- Hurley SS, Splitter GA. and Welch RA.** Deoxyribonucleic acid relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family *Mycobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bact.* 1988; 38:143-146.
- Ikiz S, Bağcıgil AF, AK S, Ozgur NY, Loaz A.** Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PZR. *Medycyna Wet.* 2005; 61:881-883.
- Johne HA, Frothingham L.** Ein eigenthümlicher fall von tuberculose beim rind (a particular case of tuberculosis in a cow). *Deut Z Tiermed Vergl Pathol.* 1895; 21:438-454.
- Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J.** Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet J.* 2004; 82: 569-73.
- Judge J, Kyriazakis I, Greis A.** Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:6033-6038.
- Kalis CHJ, Hesselink JW, Barkema HW.** Comparison of culture of individual and strategically pooled bovine faecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Manning, E.J.B., Collins, M.T. (Eds). Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison. Wisconsin. 1999; 344-8.
- Lingling L, John PB, Joseph JC, Arlo R, Yrjo TG, Robab K, Megan S, Jessica RB, Vivek K.** Identification of sero-reactive antigens for the early diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Pone.* 2017; 9(1):1-18.
- Machackova M, Svastova P, Lamka J.** Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic. *Vet Microbiol.* 2004; 101:225-34.
- Makav M. ve Gökçe E.** Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013; 19(5):913-916.
- Nielsen SS, Toft N.** A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 2009; 88:1-14.
- Öztürk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Günlü S, Güldalı Y, Turutoğlu H.** Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Israel J Vet Med,* 2010; 65:53-57.
- Selbitz HJ.** Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle M, Mayr A, eds. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 7. Aufl. Enke Verlag, pp 562-3, Stuttgart, 2002.
- Sivakumar P, Tripathi BN, Singh N.** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet Microbiol.* 2005; 108:263-70.
- Stricklands J, Scott HM., McJordan, ER.** Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2005; 88: 2432-40.
- Sweeney RW.** Pathogenesis of paratuberculosis, In: Collins, T.M. (Eds) *Johne's Disease.* Vet. Clin. Food Anim. 2011; 27:525-535.
- Thorel MF, Krichevski M and LevyFrebault VV.** Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990; 40:254-260.
- Vural B, Atala N.** Serological study on bovine paratuberculosis in central Anatolia using the microcomplement fixation and tube complement fixation tests. *Etlik Vet. Mikrobiol Derg.* 1988; 6:87-97.
- Whittington RJ ve Sergeant ESG.** Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations, *Australian Veterinary Journal.* 2001; 79:267-278.
- William CD and Kun TP.** progress towards control of a mycobacterial pathogen, *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the causative agent of johne's disease in cattle and humans. *Food Hyg.* 2018; 33(4):221-228.
- Yazıcıoğlu Ö.** Paratüberküloz, <http://www.bornovet.gov.tr/paratuberkuloz.htm>. Erişim Tarihi: 03.05.2017.
- Yıldırım D. Civelek T.** Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013; 19(1):121-126.