جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۵ صفحات ۱۲۴- ۱۲۱

بررسی حساسیت باکتری های شایع جدا شده از عفونت های ادراری در برابر سیپـــروفلوکساسین با روش دیســـک آگار دیفیـوژن و تعیین حداقل غلظـــت مهار کنندگی

مرتضی میلانی: کارشناس ارشد میکروبشناسی، آزمایشگاه بیمارستان شبستر
E-mail: mohammadmilano@yahoo.com
دکتر محمد رضا نهایی: استاد میکروبشناسی، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی
دکتر علی صادقیان: دانشیار میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، بیمارستان قائم (عج)، آزمایشگاه میکروبشناسی

دریافت: ۸۴/۶/۲۲، **پذیرش**: ۸۴/۱۲/۷

چکیده

زمینه و اهداف: مقاومت به آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در درمان عفونتهای ادراری(urinary tract infections=UTIs) در سراسر جهان در حال افزایش است. لذا اطلاع از وضعیت سویه های ایجاد کننده عفونت ادراری در برابر آنتی بیوتیکهای رایج در درمان از اهمیت خاصی برخوردار است. امروزه سیپروفلوکساسین بعنوان یک فلوروکینولون جدید جایگاه بسیار مهمی را در درمان عفونت های ادراری بخود اختصاص داده است. هدف از این مطالعه بررسی حساسیت باکتری های جدا شده ازعفونتهای ادراری نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بود.

روش بررسی : دراین مطالعه از کشت ۵۷۱ نمونه ادرار، تعداد ۱۲۲ سویه باکتری گرم منفی و گرم مثبت جدا و تمامی باکتریها از نظر حساسیت به سیپروفلوکساسین به روش دیسک آگار دیفیوژن آزمایش و MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی) آنها نیزبا روش رقت سازی در محیط کشت مایع تعیین گردید.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان می دهدکه شایع ترین باکتریها ی جدا شده *اشریشیا کلی* با ۷۸ سویه (۶۳/۹٪) و *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۲۸ سویه (۲۲/۹٪) بودندکه از این تعداد ۱۴ سویه(۱۷/۹٪) *اشریشیا کلی* و ۴ سویه(۱۴/۲٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* به سیپرو فلوکساسین مقاوم بودند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که مقاومت به سیپروفلوکساسین در بین باکتریهای عامل UTI بالا بوده و افزایش روز افزون مقاومت می تواند موجب بروز مشکلات درمانی شود. لذا ردیابی مقاومت در مناطق مختلف و اطلاع از میزان مقاومت بویژه MIC سویه های مختلف می تواند رهگشای استفاده مناسب از این آنتی بیوتیک با ارزش باشد.

کلید واژه ها: عفونت ادراری، دیسک آگار دیفیوژن، حداقل غلظت مهار کنندگـی

مقدمه

مقاومت روز افزون باکتریها به عوامل ضد میکربی مشکل عمده در سراسر جهان می باشد. از آنجائیکه باکتریها جهش پیدا کرده یا با کسب ژنهای جدید خود را با شرایط مختلف سازگار می کنند، لذا در برابر آنتی بیوتیکهای جدید می توانند مقاومت کسب کنند(۱و ۲).

پس از کشف سولفامیدها و پنی سیلین، ارگانیسمهای بیماریزا بندرت از نظر حساسیت در برابر این داروها آزمایش شده و درمان بیماران با موفقیت انجام میشد، ولی پس از گذشت مدتی مقاومت در باکتریها پدیدار و میکروبیولوژیست ها به آزمایش عوامل ضد میکروبی روی ارگانیسم ها مبادرت کردند (۳).

عـفـونـتـهای دسـتگاه اداری از عفونتهای شایع می باشد، بطوریکه در سراسر جهان هر ساله ۱۵۰ میلیون نفر به UTI مبتلا می شوند که قریب ٦ بیلیون دلار هزینه بهمراه دارد(٤و۵). بیش از ۵۰٪ زنان در طول زندگیشان حداقل یکبار به UTI مبتلا می شوند (۵). برای درمان این عفونتها از آنتی بیوتیکهایی که معمولا توانایی جذب با غلظت بالا دردستگاه ادراری را دارند، استفاده می شود. استفاده از فلورو کینولونها برای درمان تجربی UTI در مناطقی که احتمال مقاومت آنتی بیوتیکی وجود دارد، ترجیح داده می شود (٦و۷).

در بین فلوروکینولونها، سیپروفلوکساسین برای درمان UTI بیشترین کاربرد را دارد، زیرا بصورت خوراکی و تزریقی در دسترس است (٦و۸). بعد از معرفی فلوروکینولونها برای درمان UTI مقاومت باکتریایی بطور قابل توجهی افزایش یافته است. پیدایش مقاومت به فلوروکینولونها بطور کلی فرایند تدریجی بوده و جهش های ژنتیکی متوالی باعث آن می شوند(۷). مطالعات زیادی در سراسر جهان افزایش مقاومت نسبت به

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سیپروفلوکساسین را گـــزارش کرده اند. بعنوان مثال در کشور چین از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۲ افزایش مقاومت از ٤٦/٦٪ تا ٥٩/٤ ٪ بوده است (۹). در اسپانیا این نسبت ١٤/٧ ٪ (۱۰) و در بنگلادش به ٢٦٪ رسیده است (۱۱). در فلسطین از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۲ این رقم از ٤/١٪ به ١١/٣٪ افزایش یافته است (۱۲). با توجه به اهمیت سیپروفلوکساسین و اینکه این آنتی بیوتیک بعنوان داروی نسبتا جدید از نسل دوم فلوروکینولونها تاثیر بسیار خوبی بر ضد باکتریهای گرم منفی و تاثیر نسبتا خوبی بر ضد گرم مثبت ها دارد (۱۳) و برای درمان عفونتهای باکتریایی بویژه UTI تجویز می شود، بر آن شدیم مطالعه ای در مورد حساسیت باکتریهای شایع ایزوله شده از دستگاه ادراری بیماران در شهرستان شبستر واقع در منطقه شمالغرب کشور در برابر سیپروفلوکساسین انجام دهیم.

مواد و روش ها

در مطالعه حاضر از پودر خالص آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (تهیه شده از کارخانه Glaxo انگلستان)، دیسکهای سیپروفلوکساسین (شرکت ایران دارو)، محیط های پایه بلاد آگار، EMB و تریپتی کیس سـوی براث(Hi media) استفاده شد. باکتریهای مورد آزمایش از عفونتهای دستگاه ادراری بیماران سرپائی و بستری بیمارستان شبستردر مدت ۱۱ ماه از فروردین تا اسفند۸۳ جدا شدند. هر نمونه ادرار با استفاده از لوپ استاندارد ۰/۰۱ میلی لیتر در محیطهای پایه بلاد آگار و EMB کشت شد و بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون در دمای ٣٧ ^{o} C و شرایط هوازی، پلیتها از نظر رشد کلنی بررسی شده و شمارش کلنی ها بعمل آمد. نمونه های کشت شده که تعداد کلنی رشد یافته آنها بیش از ۱۰۰۰۰۰ cfu/ml بود و در دید مستقیم رسوب ادرار نیز لکوسیت بالا و باکتری مشاهده گردید، بعنوان عفونت دستگاه ادراری تلقی شد. سپس با استفاده از خصوصیات کلنی ها و تهیه اسمیر و رنگ آمیزی گرم، باکتریهای گرم مثبت با استفاده از تستهای کاتالاز، کوآگولاز و حساسیت به نووبیوسین تعیین هویت گردیده و باسیلهای گرم منفی نیز با کشت در محیطهای افتراقی و انجام تستهای بیوشیمیایی شناسایی شدند. تمامی باکتریهای ایزوله شده بروش دیسک آگاردیفیوژن و بر اساس استانداردهای NCCLS مورد آزمایش قرار گرفتند(١٤). سپس جهت تعیین MIC باکتریهای جدا شده در محیط کشت تریپتی کیس سوی براث حاوی ١٥٪ گلیـــسرول تلقـــیح شده و در فـــریزر ٢٠ ^{o} C- نگهداری شدند .برای انجام تست MIC ابتدا رقتهای نزولی آنتی بیوتیک به ترتیب از ٤٠ تا ٠/٠٢ میکروگرم در میلی لیتر آماده شد . یک لوله نیز فاقد آنتی بیوتیک و بعنوان لوله کنترل در نظر گرفته شد. سپس از باکتریهای رشد یافته در محیط بلاد آگار چند کلنی برداشته و درون محیط کشت تریپتی کیس سوی براث منتقل نموده و در مقایسه با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کدورت شد(۳). لذا تعداد باکتریهای هر لوله معادل $1/5\times10^{8}$cfu/m l بود. از محلول میکروبی تهیه شده به اندازه یـک میلی لیتـــر به تمام لوله ها افزوده شـد و بعد به مدت ٢٤ ساعت لوله ها انکوبه شدند

در پایان این مدت تمام لوله ها از نظر رشد باکتری کنترل شد و برای حصول اطمینان مجددا از تمام لوله ها در محیط کشت بلادآگار کشت بعمل آمد و بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون، پلیت ها از نظر رشد باکتری بررسی شد. آخرین لوله ای که رشد باکتری در آن مهار شده بود ، بعنوان غلظت MIC باکتری مورد آزمایش تعیین شد. برای کنترل کیفی آزمایش از سویه استاندارد *E. coli ATCC 25922* (تهیه شده از مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز) استفاده شد.

جدول ۱ : فراوانی باکتریهای جدا شده از ادرار

میکرو ارگانیسم های جدا شده	تعداد	در صد	زنان	مردان
اشـــریشیا کلی	٧٨	٦٣/٩	٦١	١٧
استافیلوکوکوس اورئوس	٢٨	٢٢/٩	١٧	١١
استـافیـلوکوکوس سـاپروفیتیکـوس	٩	٧/٣	٨	١
سیتروباکترفروئندی	٣	٢/٤	٣	–
انتروباکترآئروژنز	١	٠/٨	–	١
انتروکوکوس فیکالیس	٣	٢/٤	٢	١
تعداد کل	١٢٢	١٠٠	٩١	٣١

جدول ۲: سویه های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت های ادراری و MIC آنها در برابر سیپروفلوکساسین

باکتری	MIC سویه های آزمایشی(μ g/ml)										
	٢٠	١٠	٥	٢/٥	١/٢٥	/٦٣	/٣٢	/١٦	/٠٨	/٠٤	/٠٢
اشـــریشیا کلی	١٤	٦	٢	٥	٦	١٠	٩	١٣	٧	٤	٢
استافیلوکوکوس اورئوس	٤	٢	٢	٥	٧	٣	٣	٢	–	–	–

MIC: حداقل غلظت مهار کنندگی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

یافته ها

در مطالعه حاضر از تعداد ۵۷۱ نمونه ادرار کشت شده از بیماران سرپائی و بستری، ۱۲۲ سویه باکتری بعنوان عامل ایجاد عفونت دستگاه ادراری ایزوله و تعیین هویت گردیدند. از کل نمونه های ادرار کشت شده، تعداد ۳٤۵ نمونه مربوط به زنان و ۲۲٦ نمونه مربوط به مردان بود. جدول ۱ فراوانی باکتریهای جدا شده از نمونه های ادرار را به تفکیک نشان می دهد.

کلیه باکتریهای ایزوله شده از نظر تعیین الگوی حساسیت به سیپروفلوکساسین با روش دیسک آگار دیفیوژن وتعیین MIC بررسی شدند. ولی بلحاظ اینکه تعداد سویه های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *انتروکوکوس*(باکتریهای گرم مثبت) و انتروباکتر و *سیتروباکتر* (باکتریهای گرم منفی) کم بود و آزمایشهای دیسک آگار دیفیوژن و تعیین MIC برای این تعداد از نظر آماری گویای واقعیت نبود، کار بیشتر بر روی *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تمرکز یافت. از کل موارد مثبت کشت ادرار (۱۲۲ نمونه)، ۹۱ سویه باکتری (۷٤/۹٪) از نمونه ادرار زنـــان و ۳۱ مورد (۲۵/٤٪) از نمونه ادرار مردان ایزوله شد . از بین ۷۸ سویه باکتری *اشریشیا کلی* ،تعداد ۱٤ سویه (۱۷/۹٪) در آزمایش دیسک آگار دیفیوژن به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و MIC آنها ۲۰ µg/ml ≤ تعیین شد و از ۲۸ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* نیزتعداد٤سویه (۱٤/۲٪) به دیسک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و MIC این باکتریها۲۰ µ g/ml≤ تعیین شد. در جدول ۲ نتایج MIC این باکتریها نشان داده شده است.

بحث

نتایج این تحقیق میزان حساسیت باکتریهای شایع جدا شده از ادرار بیماران در برابر سیپروفلوکساسین را در شهرستان شبستر نشان می دهد. جنسیت بیماران در ارتباط با تعداد افراد مبتلا به عفونت های دستگاه ادراری مانند مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان میباشد. بطوریکه زنان در مقایسه با مردان درخواست کشت ادرار بیشتری دارند. بعنوان مثال در مطالعه ای که توسط Abu Shagra انجام گرفته است، عفونتهای ادراری در زنان سه برابر مردان ذکر شده است (۱۵). در مطالعه حاضر نیز تعداد زنـــان بیشتر از مردان بود. در این تحقیق باکتـری غالـــب و شـایـــع مثبت کشت ادرار (۱۲۲ نمونه)، ۹۱ سویه باکتری (۷٤/۹٪) از نمونه ادرار زنـــان و ۳۱ مورد (۲۵/٤٪) از نمونه ادرار مردان ایزوله شد. از بین ۷۸ سویه باکتری *اشریشیا کلی*، تعداد ۱٤ سویه (۱۷/۹٪) در آزمایش دیسک آگار دیفیوژن به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و MIC آنها بیشتر از ۲۰ µg/ml تعیین شد و از ۲۸ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز تعداد ٤ سویه (۱٤/۲٪) به دیسک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و MIC این باکتریها بیشتر از ۲۰ µ g/ml تعیین شد. در جدول ۲ نتایج MIC این باکتریها نشان داده شده است. ایزوله شده از ادرار بیماران به ترتیب *اشریشیا کلی* از گرم منفی ها و *استافیلوکوکوس اورئوس* از گرم مثبت ها بود(جدول ۱) که با نتایج حاصل از مطالعات انجام یافته مشابه، مطابقت دارد(۱۷ و۱٦). بر اساس تحقیقی که در کشور هندوستان در مورد تغییر الگوی حساسیت ضد میکروبی پاتوژنهای دستگاه ادراری صورت گرفته است، نیز *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* شایع ترین باکتریها ذکر شده اند (۱۸). با توجه به تحقیقی breakpoint سیپروفلوکساسین بیشتر از ۱٦ µ g/ml مقاوم و پایینتر از آن حساس در نظر گرفته شده است(۱۹).

لذا۹۱ /۱۷ ٪ از سویه های *اشـــریشیا کلی* و ۱٤/۲٪ از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر سیپروفلوکساسین کاملا مقاوم بودند. با بررسی که انجام شد،متوجه شدیم که تعدادی از این سویه ها از بیماران بستری یا از افرادی که درخواستهای مکرر کشت ادرار داشتند، جدا شده است که این موضوع نشانگر کسب تدریجی مقاومت توسط باکتریها و کلونیزاسیون سویه های مقاوم در محیط های بیمارستانی و احتمالا انتقال باکتریها به بیماران در مواقع دستکاری و سوند گذاری می باشد.

نتایج MIC این مطالعه در مقایسه با نتایج مطالعات انجام شده در سایر نقاط دنیا، تفاوتها و تشابه های قابل توجهی را نشان میدهد. بعنوان مثال در مقایسه با مطالعات جداگانه ای که در فلسطین در سالهای ۲۰۰۰ و ۲۰۰۲ (۱۲) انجام گرفته، میزان مقاومت به ترتیب ٤/۱٪ و ۱۵٪ ذکر شده و ۲۵µg/ml MIC تعیین شده است. نتایج تحقیق ما کاملا با این تحقیق مطابقت دارد، چرا که در مطالعه حاضر همچنانکه ذکر شـد میـــزان مقـــاومت ۱٦/۹٪ بود. علاوه بر این در کشور بنگلادش نیز نتایج مشابهی حاصل شده است(۱۱). ولی در کشورهای توسعه یافته میزان مقاومت پایین بوده و MIC نیز درحد پایینی قراردارد (۲۱-۱۹). ایـن تفاوتـــها احتمالا نـاشی از مسائـل بهداشـــتی، اجتماعی، فرهنگی و اقتصادی جوامع مختلف و حتی الگوی مصرف دارو در بین مردم می باشد. با بررسی و مقایسه نتایج تحقیقات صورت گرفته می توان نتیجه گرفت که در کشورهای توسعه یافته که مردم کمتر بدون تجویز پزشک دارو مصرف می کنند و شاید پزشکان نیز بدون انجام آزمایشهای لازم تا حد امکان دارو تجویز نمی کنند، الگوی مقاومت باکتریایی با کشورهای در حال توسعه تفاوت قابل توجهی را نشان می دهد. نتایج این مطالعه موید تطابق خوب با وضعیت کشورهای درحال توسعه می باشد.

نتیجه گیری

به نظر می رسد با توجه به افزایش مقاومت باکتریایی در برابر آنتی بیوتیکها ،مطالعه و تحقیق در مورد سایر آنتی بیوتیک های موثر و به ویژه سیپروفلوکساسین در مناطق دیگر کشور امری ضروری است تا بتوان بدینوسیله چشم انداز مناسب و قابل قبولی را در امر درمان بیماران و انتخاب آنتی بیوتیک مناسب ترسیم کرد و تا حد امکان از سریع بروز مقاومت باکتریایی جلوگیری کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند که از کلیه کادر آزمایشگاه بیمارستان شبستر و به ویژه آقای دکتر امین نوروزی که در تهیه امکانات آزمایشگاهی مساعدت کردند و خانم زینب اژدرکش که در کارهای آزمایشگاهی کمک کردند، تشکر نمایند.

References

1. Rnuka K A, Kapil A, Kabra S K, Wig N, Prasad S P, Chaudhry R. Reduced susceptibility to ciprofloxacin and gyrA gene mutation in north Indian strains of Salmonella enterica serotype typhi and serotype paratyphi A. *Microbial resistance*; 2004; **10**(2): 146-153.
2. Stamm W E, Norrby S R. Urinary tract infections. *J Infect Dis* 2001; **183**(Supp1.1): S1-S
3. Ellenjo Baron. Finegold S M. Diagnostic Microbiology. Sandlots, Mosby company. 8th edition 1990; 171-193
4. Astal Z. Increasing Ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in Gaza Strip Palestine. *Journal of Biomedicine and Biotechnology. Singapore Med J* 2005; **46**(9): 457-65
5. Barnett ben J, Stephens, DS. Urinary tract infection.An overview. *American journal of the Medical Sciences*. 1997; **314**(4): 245-49
6. Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo MR. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**: 37-45.
7. Kamberi M,Tsutsumi K, Kotegawa T, Kawano K, Nakamura K, Niki Y Nakano S. Influences of urinary pH on ciprofloxacin pharmacokinetics in humans and antimicrobial activity in vitro versus those of sparfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**(3): 525-529.
8. King D E. New classification and update on the quinolone antibiotics. *American Family Physician* 2000; **61**: 2741-2748.
9. Shao HF, Wang WP, Zhang XW Li ZD. Distribution and resistance trends of pathogens from urinary tract infections and impact on management. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2003; **9**(9): 690-696.
10. Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections. *Antimicrob Chemother* 2003; **51**(1): 69-76.
11. Iqbal J, Rahman M, Kabir MS. Increasing ciprofloxacin resist-ance among prevalent urinary tract bacterial isolates in Bangladesh. *Jpn J Med Sci Biol* 1997; **50**(6): 241-250.
12. Astal Z, Sharif F A. Abdallah S A Fahd MI. Multiresistant *Escherichia coli* isolated from women with community acquired urinary tract infections in Gaza Strip. *J Chemotherapy* 2002; **6**: 510-516.
13. Jaw S, Brok J, Betel J, Morce S. Jawetz, Melnick, & Adelbergs. Medical Microbiology. Twenty third edition. Boston, *Mc Graw- Hill* 2004; 161-195.
14. National committee for clinical laboratory standards. Wane pa. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. NCCLS publication. No 1997; M2-A6.
15. Abu Shaqra Q. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Enterob- acteriaceae* isolated from a group of jordanian patients with community acquired urinary tract infections. *Cytobios* 2000; **101**(396): 1521.
16. Semra K, Suheyla S, Cenk S, Horu G, Mehmet GBO. Increasing antimi-crobial resistance in *Escherichia coli* isolates from community acquired urinary tract infections during 1998- 2003 in Manisa, Turkey. *J Infec t Dis* 2005; 58, 159-161.
17. Stamm W, Hooton T. Management of urinary infections in adults. *N Engl J Med* 1993; **329**, 1328-1334.
18. Farooqi BJ, Shareeq F, Rizvi QK, Qureshi, HS, Ashfaq MK. Changing pattern of antimicrobial susceptibility of organisms causing community acquired urinary tract infections. *J Pak Med Assoc* 2000; **50**(11) 369-73.
19. Christine D, Sheila A, Jana M. Comparison of agar dilution, disk diffusion, microscan, and vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of Fluroquinolone resistant isolates of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 1999; 544-547
20. Lipsky BA. Urinary tract infections in men, epidemiology, pathophysi ology, diagnosis, and treatment. *Ann Intern Med* 1989; **110**: 138-50.
21. Beringer P M, Holtom P R, Rho J P. Comparing the newest fluoro quinolones, levofloxacin and spar floxacin. *Formulary* 1997; **32**: 926-43.
22. Navaneeth BV, Belwadi S and Suganthi N. Urinary pathogens resistance to common antibiotics: A retrospective analysis. *Trop Doc* 2002; **32**(1): 20-22