استخدام أزهار وأوراق نبات الداودي في عزل وتشخيص خميرة *Cryptococcus .neoformans* من عينات سريرية مختلفة

نور مهدي داخل
كلية العلوم– جامعة القادسية

نيران عبيد جاسم
كلية الصيدلة– جامعة القادسية
neeranjasim@yahoo.com

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص خميرة *Cryptococcus neoformans* من العينات السريرية من المرضى المراجعين والراقدين في كل من مستشفى الاطفال والولادة التعليمي ومستشفى الديوانية التعليمي والعيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية وفي المدة من 1/10/2014 الى 1/4/2015 , وقد كان عدد العينات التي تم الحصول عليها 420 عينة سريرية شملت 350 عينة قشع و51 عينة حروق و12 عينة من الغسيل القصبي و7 عينات من سائل النخاع الشوكي , فحصت وشخصت جميع العينات بالطرائق التقليدية وباستخدام الأوساط الزرعية الخاصة بالخميرة ,وقد تم تنميتها على أوساط محضرة لاول مرة من أوراق وأزهار نبات الداودي ودعم التشخيص باستخدام تقنية ال PCR .

الكلمات المفتاحية: Cryptococcus , أزهار نبات الداودي , أوراق نبات الداودي , PCR

Abstract:

The current study included isolation and identification of *Cryptococcus neoformans* yeast from clinical specimens from patients reviewers and admitted in both baby and birth Teaching Hospital and Al-Diwaniya educational hospital and advisory clinic for Chest and respiratory Diseases during the period from 1/10/2014 to 1/4/2015, and the number of samples was 420 clinical samples included 350 sputum sample and 51 burns sample and 12 samples of bronchial washing and 7 sample of the cerebral spinal fluid, all samples were examined and diagnosed by classical methods and by using specific cultures selective for yeast, and were growth on the cultures prepared for first time from leaves and flowers Chrysanthemum plant and the diagnosis was confirmed by a PCR technique.

Key words :Cryptococcus , Chrysanthemum flower , Chrysanthemum leaves , PCR .

المقدمة

تعد خميرة *C. neoformans* من الفطريات الانتهازية الواسعة الانتشار في العالم التي تصيب الانسان ومعظم الحيوانات (Sidrim *et al* .,2010) . ينتمي جنس *Cryptococcus* الى الفطريات البازيدية التي تنمو بشكل خمائر (Yeast–like) وهي من الخمائر الانتهازية (Opportunistic) التي تصيب الاشخاص المثبطين مناعيا (Immunocompromised) و تسبب نسب عالية من الاصابة (Morbidity) والهلاك (Mortality) وكذلك تصيب ايضا الاشخاص غير المثبطين مناعيا (Immunocompetent) (Chen *et al* .,2008) .

يضم جنس *Cryptococcus* أكثر من 100 نوع مشخص بحسب التصنيف الحديث (Fonseca *et al* .,2011) لكن الأنواع الممرضة للإنسان والحيوان قليلة جدا أهمها وأشدها إمراضية هو النوع *Cryptococcus neoformans* و *Cryptococcus gattii* وهناك فطرين هما *C . albidus* و *C . laurentii* اللذان نادرا ما يسببان المرض(Baddley and Dismukes ,2003) . تمتلك خميرة *C.neoformans* اربعة انماط مصلية اعتمادا على الخاصية المستضدية لسكريات الغلاف وهي(A, B, C, D) (Kwon–chung and Varma,2006). ويعد النمط المصلي A من أكثر الأنواع انتشارا والمسؤول عن النسبة الأكبر من حالات الإصابة بداء المكورات الخبيثة (Vu *et al* ., 2013). تمتلك الخميرة ضربين هما

C.neoformans var neoformans يضم الطرز المصلية (A, D) و *C.neoformans var gattii* في حين يضم الطرازين (B , C) (Springer and Chaturvedi ,2010).

تتميز خميرة *C . neoformans* بان خلاياها كروية الى بيضوية الشكل قطرها mm (4-6) ،محاطة بغلاف (Capsule) سميك مكون من السكريات المتعددة (Polysaccharides) يتراوح حجمه من 1 الى ، 30 مكرو متر . تتكاثر الخميرة بالتبرعم (Budding) مكونة برعما واحدا ضيق القاعدة و لا تكون خيوط فطرية حقيقية (True hyphae) و لا انبوبا جرثوميا (Germ tube) (Koneman *et al*.,1992) . تسبب خميرة *Cryptococcus neoformans* داء المكورات الخبيثة Cryptococcosis الذي يعد من الأمراض الخطرة على الصعيد العالمي (Barnett,2010) . يكون هذا المرض أكثر حدة في الأشخاص الذين يعانون من ضعف مناعي لاسيما الأشخاص الذين يعانون من نقص في خلايا T-cell (CD4) cell-mediated immunity والاشخاص المصابين بالإيدز Human immunodeficiency virus (Jarvis *et al* .,2013) . وكذلك يصيب الاشخاص الاصحاء لكن بنسب قليلة , تقريبا 95 % من حالات الاصابة بهذا المرض تحدث في البلدان ذات الدخل المتوسط والمحدود (Leal *et al* .,2008) و 80 % منها في البلدان ذات الدخل العالي (Pyrgos *et al* .,2013) .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات:

جمعت (420) عينة سريرية ,شملت (350) عينة قشع و (51) عينة حروق و(12) عينة من الغسيل القصبي و7 عينات من سائل النخاع الشوكي من الأشخاص المراجعين والراقدين في كل من مستشفى الأطفال والولادة التعليمي ومستشفى الديوانية التعليمي والعيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية وفي المدة من 1/10/2014 الى 1/4/2015 حيث تم اخذ العينات بطرق معقمة ثم نقلت الى المختبر لإجراء الاختبارات اللازمة عليها .

تشخيص الخميرة ***Cryptococcus neoformans*** **identification**

استخدمنا العديد من الطرائق لتشخيص الخميرة ومنها :

1:- الفحص المجهري Microscopic examination

وذلك بإضافة قطرة من الحبر الهندي (Indian ink) إلى قطرة من عالق الخميرة الموجود على شريحة زجاجية نظيفة ، بعدها تم الفحص تحت المجهر لملاحظة وجود المحفظة من عدمه ،أستعمل هذا الفحص لتمييز خميرة *C.neoformans* عن الخمائر الأخرى التي لا تستطيع تكوين المحفظة (Rippon,1988).

2:- النمو على وسط السابروید دكستروز أكار Growth on SDA

خططت العينات باستخدام الناقل loop على سطح الوسط SDA وبواقع ثلاثة مكررات لكل عينة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° مع متابعة الأطباق يوميا لحين ظهور النمو, استخدم هذا الوسط لعزل الخميرة (Ellis *et al* .,2007) .

3:-النمو على وسط ستيب أكار Growth on Staib agar

خططت الخميرة النامية على سطح الوسط وحضنت بدرجة حرارة 37 م° وتمت متابعة صفات نمو الخميرة على هذا الوسط وهي تغير لونها الى اللون البني , استخدم هذا الوسط لتشخيص الخميرة (Staib *et al* .,1987) .

4:النمو على وسط أوراق الداودي وأزهاره

حضرت الأوساط الزرعية وفقا لطريقة (Staib *et al* .,1987) , اذ تم وزن 50 غم من أزهار نبات الداودي واوراقه المجففة كلا على حدة ثم أضيفت الى واحد لتر من الماء المقطر المعقم وغليت لمدة نصف ساعة , ثم رشحت خلال شاش طبي وأكمل حجم الراشح بالماء المقطر الى الواحد لتر ثم اضيف 15 غم من الاكار الى الراشح وعقمت بالموصدة , بعد تعقيم الاوساط بردت واضيف لها مضاد الكلورو مفينكول ثم وزعت الأوساط في أطباق معقمة , خططت الخميرة النامية على سطح وسط كل من أوراق الداودي وازهاره المحضرة وحضنت بدرجة حرارة 37 م° وتمت متابعة صفات نمو الخميرة على هذا الوسط وهي تغير لونها الى اللون البني , استخدم هذا الوسط لتشخيص الخميرة .

5:الأختبارات البايوكيميائية Biochemical tests

A:أ ختبارتخمرالسكريات Sugars fermentation test

اجري هذا الاختبار للتحري عن قدرة الخميرة على تخمر السكريات التالية (كلوكوز ,سكروز ,دكستروز ,مالتوز ,لاكتوز) , حيث تمثلت النتيجة الموجبة بتغير لون صبغة البروموثايمول الزرقاء من اللون الأخضر الى اللون الأصفر.

B:–فحص اليوريز Urase test

اجري هذا الاختبار للتحري عن قدرة الخميرة على إنتاج إنزيم اليوريز ,حيث ان التحلل الكلي لليوريا سوف يغير لون الوسط من الأصفر الى الأحمر الأرجواني في حين يتغير الجزيئي الى اللون الوردي او البرتقالي اما عدم قدرة الخميرة على تحلل اليوريا فسوف يبقي لون الوسط أصفر .

6:طريقة التشخيص باستخدام فحص PCR

تم أجراء فحص PCR وذلك لتحري عن خميرة *C. neoformans* وذلك باستخدام البادئات الخاصة بجين ال ribosomal RNA gene الخاصة بتشخيص الخميرة .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

العزل Isolation

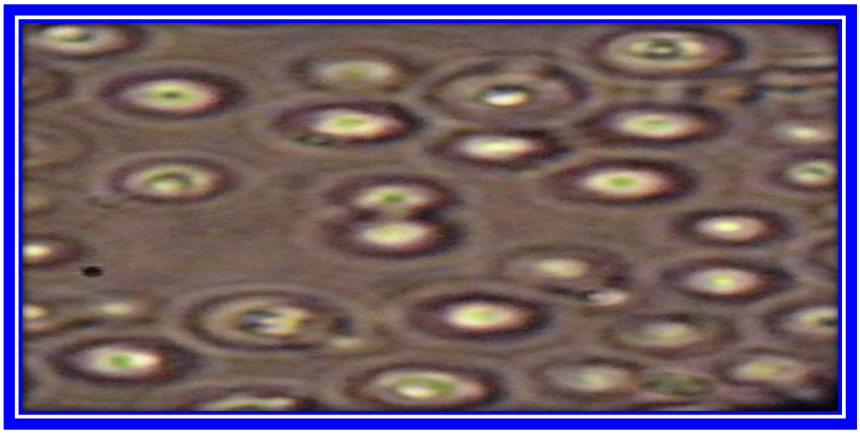
تم في هذه الدراسة عزل خميرة *C. neoformans* من العينات السريرية بالاعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية والبايوكيميائية والجزيئية, فمن مجموع 420 عينة التي تضمنت (83.33%)350 قشع , (12.14 %)51 حروق , (2.85 %)12 غسيل قصبي و7 عينات CSF وجدت الخميرة في (7.14%)30 عينة فقط التي تضمنت (6.57%)23 قشع ,(5.88 %)3 حروق ,(8.33 %)1 غسيل قصبي و(42.58 %)3 CSF , وتشير النتائج الى ان الخميرة وجدت بنسبة أكبر في عينات سائل النخاع الشوكي قياسا بالانواع الأخرى من العينات كما موضح في الجدول , ويعود السبب في ذلك لاحتواء الدماغ على مركبات مشجعة لنمو الخميرة وتكاثرها , وتتفق هذه النتائج مع ماوجده (2014)*.,et al* Lungran ; (2012) *.,et al* Hagen حيث اظهرت نتائج دراستهم ان عينات CSF تحتوي على النسبة الأكبر من الخميرة قياسا بالانواع الاخرى من العينات .

التشخيص Diagnosis

1:الفحص المجهري Microscopic examination

أظهرت نتائج الفحص المجهري للشريحة المحضرة من مستعمرات خميرة *C.neoformans* باستعمال صبغة الحبر الهندي ان خلايا الخميرة كانت كروية متبرعمة ومحاطة بهالة (موجبة لتكوين المحفظة) , وكما في الشكل 1 , وهذه النتائج تتفق مع (2015 *.,et al* Pal ; 2014.,*et al* Sharma) .

نوع العينة	عدد العينات		عدد العينات الموجبة للخميرة	
	العدد	%	العدد	النسبة المئوية %
قشع	350	83.33	23	6.57
حروق	51	12.14	3	5.88
غسيل قصبي	12	2.85	1	8.33
سائل النخاع الشوكي	7	1.66	3	42.58
المجموع	420	99.98	30	63.36



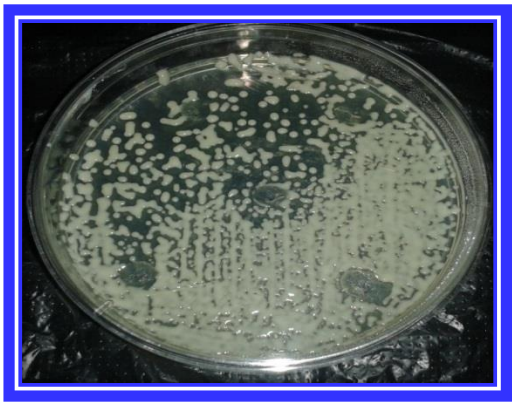
شكل (1): خلايا *C.neoformans* المصبوغة بالحبر الهندي تحت قوة تكبير 40X , حيث تظهر متبرعمة ومحاطة بهالة شفافة (الكبسولة) .

2:النمو على الاوساط الزرعية المختلفة

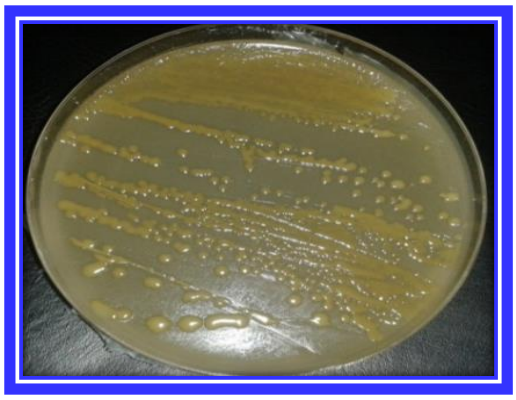
أظهرت نتائج الفحص الزرعي أن خميرة *C.neoformans* نمت على وسط SDA وبدرجة حرارة 37 م° بشكل مستعمرات دائرية بيض الى كريمية اللون ,ملساء مخاطية ,كما في الشكل (2) , وهذه النتائج تتفق مع (Hetal *et al* ., 2011; Sharma *et al* ., 2014) .

أما عند نمو خميرة *C.neoformans* على وسط ستيب اكار وبدرجة حرارة 37 م° فقد ظهرت نتائج الزرع بان الخميرة قد نمت بشكل مستعمرات كروية ,ملساء مخاطية وبنية اللون, ان تلون مستعمرات خميرة *C.neoformans* باللون البني, يعزى الى امتلاكها لأنزيم الفينول اوكسيديز phenoloxidase الذي يؤكسد المركبات الفينولية الموجودة في الوسط الزرعي مما يرسب صبغة الميلانين على جدار الخميرة مانحا اياها مستعمرات ذات لونا بني يميز مستعمراتها عن مستعمرات خميرة *Candida albicans* وهذه النتائج تتفق مع (الدليمي وشذى 2011, ; Lungran *et al.,*2014).

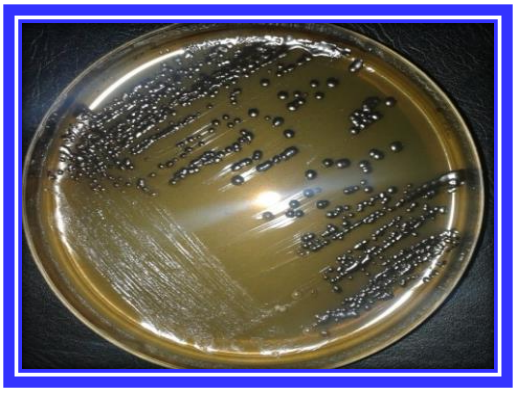
وقد تم في هذه الدراسة اختبار قدرة خميرة *C.neoformans* على النمو على أوساط محضرة لاول مرة من أزهار نبات الداودي واوراقه , وقد اظهرت النتائج أنَّ الخميرة يمكنها النمو بسهولة و بمواصفات مستعمراتها النموذجية على الأوساط سابقة الذكر و يمكن تمييز مستعمراتها بسهولة من خلال تلونها باللون البني وذلك لأن نبات الداودي يعد من النباتات الحاوية في تركيبها على تراكيز عالية من المركبات الفينولية , وقد أظهرت النتائج ان مستعمرات الخميرة النامية على وسط أزهار الداودي تكون ذات لون بني غامق قياسا بمستعمراتها النامية على وسط ستيب أكار , اما المستعمرات النامية على وسط أوراق الداودي فتكون ذات لون بني فاتح ويمكن أن يعزى ذلك الى اختلاف تراكيز المركبات الفينولية بين الأزهار والأوراق. كما في الشكل (2) , وهذه النتائج تتفق مع (الدليمي وشذى , 2011;2011 ; Katiyar *et al .,* 2013 ، Minhas *et al .,*2013 , 2015 ,Ajah).



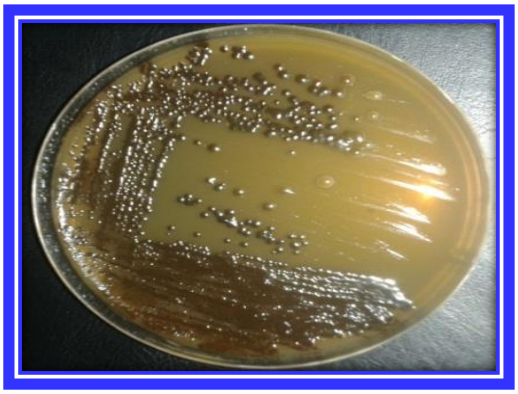
وسط SDA



وسط ستيب اكار



وسط أزهار الداودي



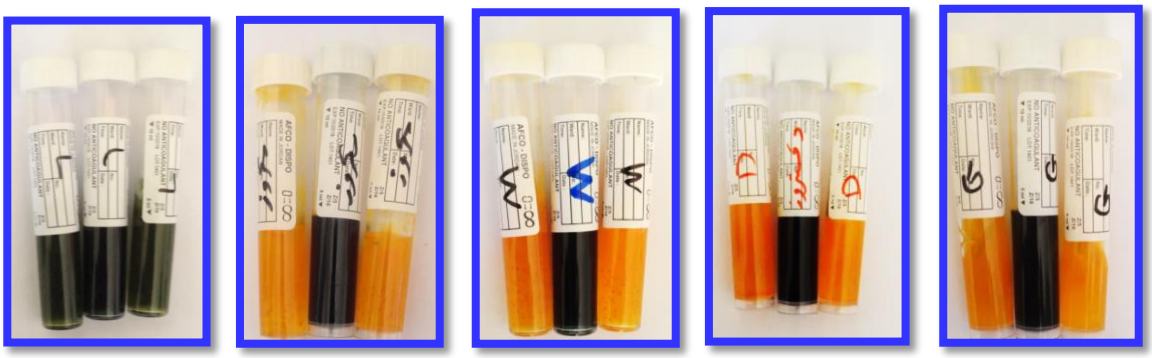
وسط أوراق الداودي

شكل (2): نمو الخميرة على الاوساط الزرعية المختلفة

3:الاختبارات البايوكيميائية Biochemical tests

A:اختبار تخمر السكريات Sugar fermentation test

تم تنمية خميرة *C.neoformans* في وسط اختبار تخمر السكريات السائل (كلوكوز,دكستروز ,مالتوز ,سكروز ولاكتوز) ,وأظهرت النتائج قدرة الخميرة على تخمر كل السكريات سابقة الذكر باستثناء اللاكتوز وذلك لافتقارها للأنزيم اللازم لأكسدة هذا السكر وتمثيله ,حيث ان الدليل على ايجابية الفحص هو تحول لون الوسط من الأخضر الى الأصفر وكما مبين في الشكل 3 وهذه النتائج تتفق مع (الكعبي ,2009) .



شكل (3): قدرة الخميرة على تخمر السكريات

B:اختبار انتاج اليوريز Urease enzyme production test

تم تنمية خميرة *C.neoformans* على وسط أكار اليوريا المائل وكذلك مرق اليوريا ,فأظهرت نتائج هذا الاختبار قدرة الخميرة على إنتاج إنزيم اليوريز حيث لوحظ تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي والذي يدل على إيجابية الفحص ,وكما في الشكل 4 , وهذه النتائج تتفق مع Khanday *et al* ., 2011 ; Gupta *et al* .) 2014) .

شكل (4): قدرة الخميرة على انتاج اليوريز

4:التشخيص الجزيئي ل *C.neoformans* باستعمال تقنية ال PCR

بعد تشخيص خميرة *C.neoformans* بالطرائق الروتينية بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرة وايضا الصفات المجهرية .شخصت جزيئيا بواسطة تقنية ال PCR للتاكد من صحة تشخيص الخميرة قيد الدراسة .اذ تم استخدام البادئات (18S rRNA gene ITS-1 region) للخميرة *C.neoformans* المصممة بواسطة برنامج التصميم Primers 3plus بعد ان تم الحصول على التسلسل الجيني للبادئ من بنك الجينات Gen bank في الموقع WWW.ncbi.nlm.nih.gov وبواسطة برنامج Optimase protocol writer تم التاكد من الدورات الحرارية للبادئ . اذ بينت النتائج أن جميع العزلات التي شخصت على انها خميرة *C.neoformans* كان تشخيصها دقيق إذ بلغ طول الحامض النووي للخميرة 502bp كما في الشكل 5 . تم استخدام التشخيص الجزيئي باستخدام تقنية ال PCR لدعم وتأكيد التشخيص المعتمد على الصفات المظهرية لما تتميز به هذه التقنية من دقة

وخصوصية عاليتين في التشخيص (ابراهيم ,2013).اذ اكد Arif *et al.,* (2012) على امكانية استخدام هذه التقنية لدعم وتأكيد التشخيص المظهري , لأنها من طرائق التشخيص القياسية المعتمدة على الحامض النووي DNA.

شكل (5): ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1%) وفولتية (70) فولت ولمدة ساعة للحامض النووي لخميرة *C.neoformans* مع البادئ ITS-1 باستخدام تقنية ال PCR حيث : (1-6) تمثل عينات الخميرة M:DNA ladder marker (100-2000)b,

المصادر

المصادر العربية

ابراهيم , مصطفى رعد جواد . (2013) . التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير .كلية العلوم – جامعة القادسية .ص:99.

الدليمي , حمزية علي عجة وشذى علي شفيق . (2011) . استخدام ثمار بعض النباتات لتحضير اوساط زرعية لعزل وتشخيص خميرة *Cryptococcus neoformans* . جامعة المستنصرية ,مجلة علوم المستنصرية . 3(1):251-262 .

الكعبي , حيدر طعمة . (2009) . عزل خميرة *C.neoformans* من براز الحمام ودراسة بعض جوانب إمراضيها في الفئران . جامعة الكوفة .مجلة جامعة كربلاء العلمية . المجلد السابع . العدد الثاني .

المصادر الاجنبية :

Ajah , H.A. (2015) . New culture medium , Fava bean (*Vicia faba)* agar for cultivation and identification of *C.neoformans* . *Iternational Journal of Advanced Research* . 3 (7) : 964 – 971 .

Arif, M .; Chawla, S.; Zaidi , N.W.; Rayar, J.K.; Variar , M. and Singh , U.S. (2012) . Development of specific primer for genus *Fusarium* and *F.solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1a) gene .African Journal of Biotechnology . 11 (2) : 444-447.

Baddley, J.W. and Dismukes , W.E. (2003) .Cryptococcosis .chapter 12 In:Clinical Mycology .Ed . W.E.; Dismukes, P.G.; Pappas and J.D.; Sobel.Exford University Press .PP.519.

Barnett , J.A. (2010) . Ahistory of research on yeasts 14 :Medical yeasts part 2 , *Cryptococcus neoformans* , yeast . 27 :875-904.

Chen , J .; Varma , A .; Diaz , M . R ., *et al* . (2008) . *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China . *Emerg Infect Dis* . 14: 755–76.

Ellis , D .; Stephen , D.; Helen , A .; Rosemary, H. and Roben , B . (2007) . Description Of Medical Fungi . Second Edition .

Fonseca , A .; Boekhout , T .; Fell , J .W. (2011) . Cryptococcus Vuillemin , p 1661-1738 *In* Kurtzman CP , Fell JW , Boekhout T , editors . (ed) , The yeasts , a taxonomic study , 5th ed Elsevier , Amsterdam , The Netherlands .

Gupta , P .; Malik , S .; Khare , V.; Banerjee , G .; Mehrotra , A .; Mehrotra , S .; Singh , M . (2011) . Afatal case of meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var . *grubii* in an immunocompetent male . *J* . *Infect* . *Dev* . *Ctries* . 5(1) : 071-074 .

Hagen , F .; Zaragozi , M .; Meis , J .; Chew , W .; *et al* . (2012) . Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population . *J* . *Clin* . *Microbiol* . 50(6): 1918-1926.

Hetal , S .; Disha , P.; Mahendra, V. (2011) . Evaluation of conventional and serological methods for rapid diagnosis of Cryptococcal meningitis in HIVseropositive patients at tertiary care hospital . *National Journal of Community Medicine* .2(3) : 354-357.

Jarvis , J.N.; Casazza , J.P.; Stone , H.H .; Meintjes , G .; Lawn , S . D .; Levitz , S.M ., *et al* . (2013) .The phenotype of the *Cryptococcus* –specific CD4 memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis .*The Journal of infectious Diseases* . 207 :1817-1828 .

Katiyar , R .; Deorukhkar , S.C and Saini , S. (2011) . Comparison of different media for the pigment production of *C.neoformans* .

Khanday , M .F .; Sivakumaar , P.K. and Kumar , S.V. (2014) . Astudy on the virulrnce factors of *C.neoformans* isolated from pigeon dropping . *Golden Research Thoughts* .3(7) : 1-8 .

Koneman , E.W.; Allen, S.D.; Jawa , W . M . and Sachreckeber , P . C. (1992) . Color Atlas and Textbook of diagnositic microbiology . 4th ed . Philadelphia. P:838-855 .

Kwon-Chung , K . J . and Varma , A . (2006) . Do major species concepts support one , two or more species within *Cryptococcus neoformans* . *FEMS Yeast Res* .6:574-587.

Leal , A . L .; Faganello , J , Fuentefria , A . M .; Bold , J . T .; Bassanesi , M . C and Vainstein , M . H . (2008) . Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do sul , Brazil . Mycopathologia . 166:71-75.

Lungran , P .; Devi , A .V .; Singh , W . S .; Damroulien , S .; Mate , H and Golmei , A . (2014) . Cryptococcosis :Its prevalence and clinical presentation among HIV positive and negative patients in Rims , Manipur .*IOSR-JDMS* . 13(7) :38-41.

Minhas , N .; Patil , S and Sharma , P .C. (2013) . Novel preparation of culture media for cultivation of *Cryptococcus neoformans* with extracts of different plant products . *Int* . *J* . *Pharm* . *Sci* . *Rev* . *Res* . 24(1) : 70-75 .

Pal , D .; Das , A .; Pal , S .; Chatterji , S .; Ghosh , M . K .; Naskar , A .; Mallik , S . and Chakrabarty , A . (2015) . An unusual presentation of disseminated cryptococcosis in a middle aged femals . 3(2): 2329 – 9088.

Pyrgos , V .; Seitz , A . E .; Steiner , C . A .; Prevots , D . R and Willianmson , P . R . (2013) . Epidemology of cryptococcal meningitis in the US:1997-2009 . *PLOS one* . 8:e56269.

Rippon , J . W . (1988) . Medical Mycology :the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes . 3rd ed .Philadelphia , W B Saunders .

Sharama , R . ; Das , A .; Duggal , N and Hans , C . (2014) . Cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient . *Sch* . *J* . *Med* . 2(6):414-416.

Sidrim , J . J .; Costa , A . K .; Cordeiro , R . A .; Brilhante , R . S . and Moura , F . E ., *et al* . (2010) . Molecular methods for the diagnosis and characterization of cryptococcus : Areview . *Can* . *J* . *Microbiol* . 56:445-458.

Springer , D . J . and Chaturvedi , V . (2010) . Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii* . *Emerg* . *Infect* . *Dis* .16(1) :14-20 .

Staib , F .; Seibold , M .; Antweller , E .; Frohlich , B .; Weber , S . and Blisse , A . (1987) . The Brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis , control and epidemiology of *C* . *neoformans* in AIDS patients . *Zbl* . *Bakt* . *Hyg* . A266:167-177 .

Vu , K .; Eigenheer , R . A .; Phinney , B . S .; Gelli , A . (2013) . *Cryptococcus neoformans* promotes its transmigration into the central nervous system by inducing molecular and cellular changes in brain endothelial cells . *Infect* . *Immun* . 81: 3139-3147 .