

شیوع حلقی استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک گروه A در کودکان دبستانی شهر زاهدان در سال ۱۳۸۰

دکتر اباصلت برجی*، دکتر شهرام شهرکی زاهدانی*، دکتر تقی ناصرپور فریور*

دکتر اصغر فضایی**، دکتر امیر حسین محققى فرد*، دکتر محمد بکائیان *

نویسنده‌ی مسئول: زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیشناسی ab-borji@yahoo.co.uk

دریافت: ۸۳/۵/۱۷ پذیرش: ۸۴/۱۰/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: فارنژیت و عارضه‌ی مهم رماتیسم قلبی ناشی از عفونت با استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A، یکی از مشکلات عمده‌ی بهداشتی - درمانی کودکان می‌باشد. از آنجایی که حاملین این باکتری نقش موثری در انتشار عفونت در خانواده و مدرسه دارند و با توجه به مواردی که از مقاومت دارویی مشاهده شده است، این مطالعه جهت تعیین شیوع نسبی کلونیزاسیون حلقی استرپتوکوک گروه A در کودکان دبستانی شهر زاهدان و تعیین مقاومت دارویی آن در سال ۱۳۸۰ انجام شد.

روش بررسی: از گلوئی ۵۵۵ دانش آموز دختر و پسر سالم (بدون علاومت فارنژیت) دبستان‌های ابتدایی سطح شهر که به روش نمونه‌گیری خوشه‌ای و طبقه‌ای انتخاب شده بودند، طی فصل زمستان با سواب استریل نمونه برداری شد و پس از کشت در محیط بلاد - آگار و جدا سازی باکتری، آزمایش حساسیت ضد میکروبی انجام شد. نتایج با استفاده از آمار توصیفی و تحلیلی (آزمون کای دو) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: شیوع حلقی استرپتوکوک بتا همولیتیک A ۱۰/۱ درصد (۵۶ نفر) تعیین شد. میزان کلونیزاسیون در دختران (۱۰/۱۷ درصد) کمی بیشتر از پسران (۱۰ درصد) بود. اگر چه میزان شیوع این باکتری در پایه‌های آموزشی با هم تفاوت داشته است (پایه‌ی اول ۱۶/۳ درصد، پایه‌ی دوم ۷/۲ درصد، پایه‌ی سوم ۱۰ درصد، پایه‌ی چهارم ۶/۳ درصد و پایه‌ی پنجم ۱۰/۸ درصد)، ولی آزمون کای دو اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. تمامی سوش‌های به دست آمده نسبت به سه آنتی بیوتیک پنی سیلین، اریترومايسين و سفیکسیم حساس بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل بیان‌گر لزوم توجه به مسائل بهداشتی کودکان و تدوین برنامه‌های پیشگیری و کنترل بیماری‌های ناشی از استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A و عوارض مهم ناشی از آن می‌باشد.

واژگان کلیدی: استرپتوکوک بتاهمولیتیک A، گلودرد استرپتوککی، استرپتوکوکوس پیوژنز

مقدمه

همه‌ی نقاط دنیا وجود دارد. اهمیت منحصر به فرد این باکتری به دلیل دو عارضه‌ی مهم غیر چرکی آن یعنی تب روماتیسمی حاد و گلودردونفریت حاد می‌باشد که به خصوص عارضه‌ی اول به دنبال فارنژیت استرپتوککی ایجاد

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A
(Group A Betahaemolytic Streptococcus [GABHS])
یکی از شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای انسان است که در

* متخصص میکروبیشناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

** متخصص انگل شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

مدارس این شهر در دو مرحله در سال ۱۳۷۵، ۴ درصد و ۴/۸۶ درصد (۸) و در مطالعه‌ی دیگری که در گرگان در سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۷۸ انجام شده، شیوع حاملین در کودکان دبستانی این شهر ۱۱ درصد گزارش گردیده است (۴). در یک بررسی در شرق تهران این میزان ۲/۲ در صد گزارش شد (۹).

پنی‌سیلین به عنوان درمان انتخابی عفونت‌های ناشی از استرپتوکک بتاهمولیتیک گروه A، توسط انجمن قلب آمریکا و آکادمی کودکان آمریکا، اعلام شده است. در موارد آلرژی به پنی‌سیلین، اریترومايسين داروی انتخابی است. هم‌چنین سفالوسپورین‌های خوراکی در درمان فارنژیت استرپتوککی بسیار مؤثر هستند ولی از سولفونامیدها و تتراسیکلین به خاطر مقاومت زیاد نباید استفاده کرد (۱). اولین بار مقاومت به اریترومايسين در سال ۱۹۵۵ در ایالت کینگدام مشاهده شد و اخیراً به طور شایع در ژاپن، فنلاند، تایوان، استرالیا، آمریکا، اسپانیا و ایتالیا گزارش شده است (۱۰). نتایج یک مطالعه در فرانسه نشان داد که حدود ۶/۲ درصد از موارد به اریترومايسين مقاوم بوده اند (۱۱). در مطالعه‌ی دیگری در اسپانیا مقاومت به بتالاکتام‌ها دیده نشد. اما در مورد ماکرولیدها ۲۷/۱ درصد مقاومت دیده شد (۱۲). در پژوهش دیگری در اسپانیا، میزان شیوع گونه‌های مقاوم به اریترومايسين در طی سال‌های ۱۹۹۵ تا ۱۹۸۷ زیر ۵ درصد بود که تفاوت بین میزان مقاومت در سال ۱۹۹۵ (۲/۶ درصد) و ۱۹۹۶ (۱۷/۱ درصد) از نظر آماری قابل توجه بود (۱۳).

در یک بررسی که در قزوین صورت گرفته است ۱۰۰ درصد سوش‌ها به پنی‌سیلین و اریترومايسين حساس بودند (۱۴). در مطالعه‌ای که در دانش آموزان مدارس پیتسبرگ از اکتبر سال ۲۰۰۰ تا ماه می ۲۰۰۱ صورت گرفت، از ۱۷۰۴ مورد کشت گلو، ۳۱۸ مورد (۱۸ درصد) استرپتوکک پیورژن جدا شد که ۴۸ درصد سویه‌ها به اریترومايسين مقاوم بودند ولی هیچ مورد مقاومتی به کلیندامایسین مشاهده نشد (۱۵).

می‌شود (۱). این ارگانیزم عامل ۲۰ تا ۴۰ درصد فارنژیت‌های چرکی کودکان است (۲). فارنژیت استرپتوککی به طور اولیه در بین بچه‌های ۵ تا ۱۵ ساله شایع است. حداکثر شیوع سنی آن در سال‌های اولیه‌ی دبستان است و از نظر فصلی بیشترین شیوع آن در اواخر زمستان و اوایل بهار دیده می‌شود. این ارگانیزم اغلب در گلو و بینی افراد بدون علامت کلونیزه می‌شود (۳-۱). میزان حاملین (افرادی که ارگانیزم را در گلو یا بینی خود دارند، اما علائم عفونت حاد را ندارند) بر اساس سن، موقعیت جغرافیایی، فصل سال، شرایط آب و هوایی و مدت تماس با افراد مبتلا متفاوت است (۲، ۱). حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد کودکان، حامل حلقی این باکتری می‌باشند و این میزان در بالغین بسیار کمتر است. روش اصلی انتقال عامل بیماری‌زا از طریق تماس نزدیک و ریز قطره‌های خارج شده از دهان بیماران و حاملین می‌باشد و در نواحی پر جمعیت مثل سربازخانه‌ها و مدارس میزان انتشار بیشتر است (۴، ۳، ۱). خوشبختانه خطر بروز تب روماتیسمی حاد در افراد حامل بسیار کمتر از افراد مبتلا به فارنژیت است، تنها خطر این است که فرد حامل به عنوان منبع بالقوه انتشار عفونت در خانواده یا محیط مدرسه، سلامت دیگران را به خطر می‌اندازد (۲).

در مطالعه‌ی دانشگاه روچستر فراوانی حاملین در کودکان سالم ۲/۵ درصد (۵) و در زاگرب، این میزان ۶ درصد در تمام سنین و ۱۱/۷ درصد در کودکان ۶ تا ۱۴ ساله گزارش گردیده است (۶). در مطالعه‌ای که در لندن (۲۰۰۱) صورت گرفت، شیوع استرپتوکک گروه A در جمعیت یهودی، بالاتر از جمعیت عمومی بود به طوری که شیوع آن در کودکان یهودی مبتلا به فارنژیت و سالم (حاملین) به ترتیب ۱۷/۴ و ۵/۹ درصد بود، در حالی که در جمعیت عمومی این میزان به ترتیب ۳/۴ درصد و صفر بود (۷). در برخی از مطالعات قبلی انجام شده در کشورمان از جمله در مطالعه‌ی انجام شده در اصفهان، فراوانی حاملین این باکتری در تعدادی از

آزمایش کاتالاز انجام می‌شد. در صورت منفی بودن این آزمایش مشخص می‌شد که استرپتوکوکوس بتا همولیتیک است. در مرحله‌ی بعد برای تعیین هویت آن از حساسیت به دیسک باسیتراسین ۰/۰۴ واحدی (که در صورت حساسیت هاله عدم رشد با قطر بیش از ۱۵ میلی‌متر) و مقاومت در برابر کوتریموکسازول استفاده شد. به منظور تعیین مقاومت دارویی (به روش استاندارد دیسک دیفوزیون کربی - بائر) از کلنی‌های این باکتری برداشت نموده و در محیط بلاد آگار کشت داده و از دیسک‌های آنتی بیوگرام پنی سیلین، اریترومايسين و سفیکسیم بر روی محیط کشت قرار داده و پلیت‌ها را در گرمخانه در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گذاشته و پس از آن قطر هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری و با اندازه‌ی استاندارد مقایسه، مقاومت و حساسیت آن مشخص گردید.

نتایج

در مجموع ۵۵۵ نمونه کشت داده شد که ۲۷۰ نمونه از پسران و ۲۸۵ نمونه از دختران بود. استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A از ۵۶ نمونه‌ی مورد آزمایش (۱۰/۱ درصد) جدا شد (جدول ۱).

بررسی این باکتری در پایه‌های آموزشی مختلف نشان می‌دهد که تعداد حاملین در پایه‌ی اول ۱۸ نفر (۱۶/۳ درصد)، در پایه‌ی دوم ۸ نفر (۷/۲ درصد)، در پایه‌ی سوم ۱۱ نفر

جدول ۱: فراوانی حاملین استرپتوکوک گروه A بر حسب جنس دانش‌آموزان دبستانی، زاهدان ۱۳۸۰

جنس	حامل	بلی	خیر
پسر	۲۷ (۱۰)*	۲۷	۲۴۳ (۹۰)
دختر	۲۹ (۱۰/۱۷)	۲۹	۲۵۶ (۸۹/۸۳)
جمع	۵۶ (۱۰/۱)	۵۶	۴۹۹ (۸۹/۹)

* اعداد داخل پرانتز بیان‌گر درصد می‌باشند.

با توجه به فقدان اطلاعات لازم از میزان حاملین این باکتری به ویژه در سنین کودکی و ویژگی‌های جغرافیایی و آب و هوایی منطقه، و نیز با توجه به این که یکی از اهداف طرح ملی پیشگیری اولیه تب روماتیسمی در مدارس ایران تعیین میزان حاملین این باکتری می‌باشد (۶) و با عنایت به افزایش شیوع مقاومت به اریترومايسين، این پژوهش با هدف تعیین شیوع حلقی استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A در کودکان دبستانی زاهدان در سال ۱۳۸۰ انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه‌ی توصیفی بر روی کودکان دبستانی شهر زاهدان انجام شد. به منظور نمونه‌گیری شهر به ۵ منطقه تقسیم شد و از هر منطقه ۲ دبستان (یکی دخترانه و یکی پسرانه) انتخاب شد و سپس تعداد نمونه‌ی لازم به روش تصادفی خوشه‌ای و طبقه‌ای انتخاب شدند. افرادی که در معاینه‌ی بالینی کامل فاقد هر گونه علائم فارنژیت (تب، لرز، بی‌حالی، گلو درد، آبریزش بینی و التهاب و قرمزی حلق) بودند وارد مطالعه شدند.

نمونه برداری توسط سوآپ استریل از ناحیه‌ی فارنکس و سطح هر دو لوزه انجام شد. سپس نمونه‌ها در یک لوله‌ی آزمایش استریل به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌ها در محیط ژلوز خون‌دار به صورت خطی (Streak) کشت داده و لوپ آغشته به نمونه در چند نقطه‌ی محیط به طور عمقی تلقیح گردید (برای ایجاد شرایط بی‌هوازی برای فعالیت استرپتولیزین O) و سپس محیط کشت را در شرایط هوازی در ۳۵ تا ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در گرمخانه گذاشته و بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها از نظر وجود کلنی‌های استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک بررسی شدند. در صورت عدم مشاهده‌ی کلنی، پلیت‌ها را ۲۴ ساعت دیگر در گرمخانه گذاشته و دوباره مورد بررسی قرار گرفت که در صورت مثبت بودن، از نمونه لام تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام و اگر کوکسی گرم مثبت بود

جدول ۲: فراوانی حاملین استرپتوکوک گروه A بر حسب پایه‌ی آموزشی دانش آموزان دبستانی، زاهدان ۱۳۸۰

پایه‌ی آموزشی	حامل	بلی	خیر
اول	۱۸	(۱۶/۳)*	۹۳ (۸۳/۷)
دوم	۸	(۷/۲)	۱۰۳ (۹۲/۸)
سوم	۱۱	(۱۰)	۱۰۰ (۹۰)
چهارم	۷	(۶/۳)	۱۰۴ (۹۳/۷)
پنجم	۱۲	(۱۰/۸)	۹۹ (۸۹/۲)
جمع	۵۶	(۱۰/۱)	۴۹۹ (۸۹/۹)

* اعداد داخل پرانتز بیان‌گر درصد می‌باشند.

(۱۰ درصد)، در پایه‌ی چهارم ۷ نفر (۶/۳ درصد)، و در پایه‌ی پنجم ۱۲ نفر (۱۰/۸ درصد) بود. جدول (۲) نتایج انجام آنتی بیوگرام نشان داد که ۱۰۰ درصد سوش‌های استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A به پنی سیلین، اریترومایسین و سفیکسیم حساس هستند.

بحث

نتایج پژوهش نشان داد که ۱۰/۱ درصد از نمونه‌های پژوهش حامل استرپتوکوک بتاهمولیتیک A هستند. در مطالعات قبلی که در شرق تهران و اصفهان (طی دو مرحله) انجام گرفته است (۸،۹) میزان شیوع حاملین به ترتیب ۲/۲ درصد، ۴ درصد و ۴/۸۶ درصد ذکر شده که نشان دهنده‌ی شیوع پایین‌تری نسبت به مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان می‌باشد. در مطالعه‌ی ای که در زمستان سال ۱۳۷۸ در گرگان انجام شد (۴)، میزان شیوع ناقلین استرپتوکوک گروه A برابر ۱۱ درصد گزارش گردید که میزان آن در دختران ۱۰/۸ درصد و در پسران ۱۱/۲ درصد بود. در مطالعه‌ی ما نیز میزان شیوع حاملین ۱۰/۱ درصد به دست آمد که این میزان در پسران ۱۰ درصد و در دختران ۱۰/۱۷ درصد بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری بین دو جنس وجود ندارد که با

مطالعات قبلی نیز مشابهت دارد ولی با مطالعات انجام شده در تهران و اصفهان متفاوت است.

نتایج به دست آمده در این مطالعه و همچنین مطالعه‌ی انجام شده در گرگان نسبت به دو مطالعه‌ی قبلی کشورمان مطابقت و همراهی بیشتری با نتایج جهانی دارد، مثلاً در مطالعه‌ی انجام شده در زاگرب، میزان شیوع ناقلین ۱۱/۷ درصد بوده است (۶). با توجه به این که میزان شیوع حاملین تابعی از شرایط آب و هوایی، تراکم جمعیت و مناطق جغرافیایی و فصل سال می‌باشد، این اختلاف نتایج در نقاط مختلف کشورمان قابل توجیه است و با توجه به این که فصل انجام بررسی در مطالعه‌ی ما و گرگان یکسان بوده است، همانندی بیشتری دیده می‌شود. از طرفی با توجه به این که زاهدان از مناطق با آب و هوای گرم و خشک است، انتظار می‌رود که میزان ناقلین حلقی استرپتوکوک گروه A نسبت به گرگان و سایر مناطق که آب و هوای معتدل دارند کمتر باشد. بر اساس این بررسی، تمام سوش‌های استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A نسبت به سه آنتی بیوتیک پنی سیلین، اریترومایسین و سفیکسیم حساس بودند. در مطالعاتی که در نقاط دیگر جهان انجام شده نیز مقاومت نسبت به پنی سیلین و سفیکسیم دیده نشده است ولی مقاومت نسبت به اریترومایسین در چندین نقطه‌ی دنیا مشاهده شده و حتی در حال افزایش است (۱۲،۱۳). در مطالعاتی که در اصفهان و قزوین، صورت گرفته است نیز نتایج مشابهی به دست آمده و هیچ موردی از مقاومت نسبت به این سه آنتی بیوتیک دیده نشده است (۷،۱۲). البته یکی از محدودیت‌های این قسمت از مطالعه، استفاده از روش دیسک دیفوزیون به جای روش رقت لوله‌ای جهت تعیین حساسیت دارویی بود که این روش از حساسیت روش رقت لوله‌ای برخوردار نیست، با این وجود در مطالعه‌ی انجام شده در قزوین که از روش رقت لوله‌ای استفاده شده، نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی ما مشابه است.

نتیجه گیری

و مقاومت دارویی آنها ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا پیشنهاد می‌گردد که علاوه بر ادامه‌ی مطالعه و بررسی شیوع حاملین استرپتوکوک پیوژنز در سایر رده‌های سنی و به ویژه مقطع تحصیلی راهنمایی، بررسی دوره‌ای حساسیت دارویی این ارگانیسم جهت برنامه‌ریزی‌های مطلوب‌تر بهداشتی درمانی نیز انجام شود.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از شورای پژوهش دانشگاه علوم پزشکی زاهدان به خاطر تأمین بودجه این طرح تحقیقاتی و نیز از پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی پزشکی به ویژه جناب آقای مجریان، تشکر و سپاس‌گزاری می‌گردد.

بنابراین با توجه به نتایج حاصله و مقایسه آن با سایر مطالعات داخل و خارج کشور به نظر می‌رسد که ادامه‌ی مطالعه با اهداف اشاره شده در طرح ملی پیشگیری از تب روماتیسمی و نیز از طریق تعیین سروتیپ‌های مختلف استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A به منظور بررسی‌های همه‌گیر شناختی و به کارگیری روش‌های مناسب برای پیشگیری ضروری می‌باشد. هم‌چنین از آنجا که هر چه میزان حاملین در منطقه بیشتر باشد به علت انتشار مکرر در جامعه و پاساژهای متعدد، بیماری‌زایی این باکتری و بروز عوارض چرکی و غیر چرکی آن بیشتر می‌شود، بنابراین شناسایی دقیق‌تر حاملین و نیز موارد فارتزیت

منابع

- 1- Bisno AL, De Rijn EV. *Classification of Streptococci*. in: Mandell GL, Benetts JE, Dolin R (editors). *Principle and Practice of Infectious Disease*. 5th ed. Newyork: Churchill Livingston; 2000, 2100 - 127.
- 2- Wessels MR. *Streptococcal and Entrococcal Infection*. In: Harrison S (editor). *Principle of Internal Medicine*. 15th ed. New york: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001, 902-92.
- ۳- محرّر مینو. در ترجمه‌ی میکرووب شناسی پزشکی جاوئز. چاپ اول. تهران: نشر سماط ۱۳۷۸، صفحات ۲۶۱ تا ۲۷۳.
- ۴- قائمی عزت ا.،، تبراوی علیجان، فاضلی محمدرضا و همکاران. میزان شیوع ناقلین استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A در کودکان سالم دبستانی شهرستان گرگان. *مجله‌ی علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان* ۱۳۷۹؛ شماره ۶: صفحات ۵۵ تا ۶۸.
- 5- Pichichero ME, Marsocci SM, Murphy ML, etal. Incidence streptococcal carriers in private pediatric practice. *Arch Pediatr Adolesce Med*. 1999; 153 (6): 624-8.
- 6- Begouane J, Bodina E, Benie B etal. Asymptomatic pharyngeal carriage of Beta hemolytic streptococci and streptococcal pharyngitis among patient's at an urban hospital in croatia. *Eur J Epidemiol*. 1993; 9:45 - 50.
- 7- Spitzer J, Henessy E, Neville L. High group A streptococcal carriage in the orthodox Jewish community of north Hackney. *Br J Gen Pract*. 2001; 51 (463): 101-5.
- ۸ - توکلی اکبر، ایرجیان غلامرضا، فرشاد شهره. فراوانی ناقلین استرپتوکوک پیوژنز در دانش آموزان دختر و پسر تعدادی از مدارس ناحیه ۳ آموزش و پرورش اصفهان. *مجله دانشکده پزشکی اصفهان* ۱۳۷۷؛ سال شانزدهم، شماره ۵۰: صفحات ۳۳ تا ۴۵.
- ۹- سلطان زاده محمد حسین. بررسی شیوع استرپتوکوک در مدارس شرق تهران در سال ۱۳۷۲-۱۳۷۳. *مجله طب و تزکیه* ۱۳۷۸، شماره ۳۴: صفحات ۴۲ تا ۴۵.
- 10- Bassett M, Manno G, Collida A, etal. Erythromycin resistance in streptococcal pyogenes in Italy. *Emerg Infect Dis*. 2000; 6 (2): 180 -3.

- 11- Bingen E, Fitouss F, Doit C, et al. Resistance to macrolid a in streptococcal pyogens in France in ped iatric patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 44 (6): 1453-7.
- 12- Betriu C, Casado MG, Gomes M, Sanchez A, Palan MI, Picazo JJ, et al. Incidence of erythromycin resistance in streptococcal pyogenes, a 10 Year study. *Diagn Microbial Infect Dis.* 1999; 33 (4): 255-6.
- 13- Baquero F, Garcia JA, Delomas JG, Aguilar L, et al. Antimicrobial resistance of 914 Beta hemolytic strepto cocci isolated from pharyngeal swabs in Spain. *Antimicrob Agent chemother.* 1999; 43 (1): 178-80.
- ۱۴- کمالی ابوالقاسم، دانشی مهدی، خیر خواه محمد رضا و همکاران. میزان حساسیت استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A به پنی سیلین. *مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین* ۱۳۸۰؛ شماره ۱۷، صفحات ۶۸ تا ۷۲.
- 15- Martin JM, Green M, Berbadora KA. Erythmycin resistant group A streptococci in school children in Pittsburgh. *N Eng J Med.* 2002; 346 (16): 1200-6.
- 16- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS *Baily & Scott's Diagnostic Microbiology.* 10th ed. Baltimore: Mosby Co; 1998, 620-35.