

DETECTION ON CAMPYLOBACTER FETUS IN SHEEPING NORTH AREA OF SYRIA

M.ELEWE* and Y.AL-YASENO**

* Dept. of infectious Diseases, Fac.Vet. Med. AL-Baath University.

** Dept. of infectious Diseases, Fac.Vet. Med. AL-Baath University.

Email: mhmadelewe@hotmail.com

ABSTRACT

Received at: 30/6/2014

Accepted: 10/9/2014

This study has been carried out on 202 aborted ewes in 15 sheep flocks in 4 Syrian provinces (Aleppo - Alraqa- Alhasaka- Der alzor). Then the bacterial and biochemical tests have been carried out 202 samples. The samples were taken from the aborted ewes and its fetuses. The samples of aborted ewes are (gall-bladder, placenta, vaginal swabs) and the samples of fetuses are (liver, spleen, kidney, stomach contents). It has been proved that 15 isolates have shown positive results for campylobacter fetus which equals 7.4%. The highest percentage of abortions caused by campylobacter in Aleppo was 10.5%, whereas it was 6.9% in Alraqa, the percentage was 5.4% in Der alzor. No positive results have been recorded in Alhasaka. Most of positive isolates from ewes managed in concentrated system.

Key words: *Campylobacter, abortion, fetus.*

الكشف عن المقوسة الجنينية في المنطقة الشمالية من سورية

محمد العطوي ، ياسين الياسينو

Email: mhmadelewe@hotmail.com

أجريت الدراسة على ٢٠٢ نعجة أخذت من ١٥ قطيع أغنام من أربع محافظات سورية (حلب - الرقة - الحسكة - دير الزور). ثم أجريت الاختبارات الجرثومية والكيميابحثية على ٢٠٢ عينة من الأغنام المجهضة وأجذتها وكانت عينات الأغنام المجهضة هي من (المراة، المغصبة، المسحات المهبلية) وعينات الأجنة المجهضة من (الكبد، الطحال، الكلي، محتويات المعدة). وقد ثبت أن ١٥ عزولة أثبتت نتائج إيجابية للمقوسة الجنينية أي بنسبة ٧.٤%. حيث سجلت أعلى نسبة للإجهاض بالمقوسة الجنينية في محافظة حلب ١٠.٥%، بينما بلغت نسبة الإجهاض بالمقوسة الجنينية في محافظة الرقة ٦.٩%， أما في محافظة دير الزور فقد كانت النسبة ٥.٤%， في حين لم يسجل في محافظة الحسكة أي حالة إيجابية ووجد أن معظم العزولات الإيجابية للمقوسة الجنينية كانت من الأغنام المرتبطة بطريقة مكثفة.

INTRODUCTION

المقدمة

أول من كتب عن المقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية كان العالم Escherich ، حيث كتب مقالة علمية تضمنت وصف لجرائم لولبية أخذت من الأطفال الذين ماتوا بما يسمى كوليير الأطفال 'cholera infantum' (Friedman et al., 2000 ; Dasti,2007). عزلت الجراثيم المعروفة الآن بالمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية بنجاح في بداية هذا القرن في بريطانيا حيث عزل العالمان McFadyean and Stockman هذه الجراثيم من أجنة الأغنام المجهضة ولوحظ أنها تشتهي الضمات related vibrio (McFadyean and Stockman, 1913). اكتشف العالم Smith جراثيم لولبية في أجنة الأبقار المجهضة واستنتج أن هذه الجراثيم والجراثيم الشبيهة بالضمات related vibrio تتنتهي إلى نفس النوع (Smith, 1918). وبسبب شكلها الذي يشبه الضمة أطلق اسم الضمات الجنينية "Vibrio fetus" على هذه الجراثيم وسمى المرض الذي تسببه هذه الجراثيم الإجهاض الضمي "vibrionic abortion" (Skirrow, 1977; Fox, 1982; Butzler, 1984; Franco, 1988). اسم المقوسات مشتق من الكلمتين اليونانيتين (kampulos καμπύλος) وتعني المقوسة (baktron βακτρόν) وتعني العصا (Sebald and Veron, 1963). تحصل العدوى عن طريق تناول الأغذية الملوثة باللطف والماء الملوثين بالعامل المسبب (Dyre,2008). تنتقل المقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية عن طريق تناول الأغذية الحامل للأنسجة الجنينية المخموحة وبعد أن يحدث الإجهاض الأول المقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية تتعرض أغنام حوالن أخرى لأعداد كبيرة من الجراثيم بسبب تناولها مختلفات الإجهاض وبالتالي ينتج عنها إجهادات أكثر (Jensen et al., 1961). أما العرض الأساسي للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية هو الإجهاض في الأسابيع الست الأخيرة من الحمل أو ولادة حملان ضعيفة (Mearns, 2007). إذا حدثت العدوى أثناء الحمل المبكر فلن يحدث الإجهاض بسبب امتصاص الجنين ، وإذا حدثت العدوى في منتصف الحمل فسيحدث الإجهاض بعد 10-20 يوم ، وإذا حدثت في آخر الحمل سيتولد ولادة حملان ضعيفة أو ميتة (Justin and Luther,2006). ولا يوجد عادة علامات تسقيف الإجهاض ، لكن أحياناً يحدث سيلان مهلي قبل الإجهاض ويحدث احتباس مشيمية عند عدد كبير من الأغنام المجهضة ويترافق هذا الاحتباس بسوء حالة الحيوان العامة نتيجة التهاب المجرى التالوني بسبب العدوى الثانوية (Hum et al., 2009). كما أن وقت العدوى له أهمية في تحديد نسبة الإجهاض حيث أنه في العدوى التجريبية عند اليوم 105 من الحمل تجهض 100% من الإناث الحوامل ، وإذا حدثت العدوى بعد 3 أسابيع من ذلك تنخفض نسبة الإجهاض إلى 20% وهذا ربما يعكس زيادة المناعة عند الجنين (Grogono-Thomas et al.,

(2000). يمكن عزل المقوسة الجينية تحت نوع الجنينية من المشيمة والدم ومحتويات الأمعاء والمرارة والإفرازات المهبلية من الأغذام المخموجة ومن محتويات المعدة والقلب والدم والكبد والرئة من الجنين المجهض.
يهدف البحث إلى الكشف عن المقوسة الجينية في المنطقة الشمالية من سوريا.

MATERIALS and METHODS

مواد وطرق البحث

جمع العينات: تم جمع 202 /عينة من أربع محافظات في سوريا وهي :/ حلب ، الرقة ، دير الزور، الحسكة /، حيث جمعت العينات من الأغذام المجهضة وهي (المرارة ، المشيمة ، الإفرازات المهبلية). وأيضاً أخذت عينات من الأجنحة المجهضة (الكبد ، الطحال ، الرئة ، الكلية ، محتويات معدة الجنين). ثم نقلت العينات بشروط صحية عقيمة في حافظات تحوي على الجليد ، وتم حفظها في درجة حرارة -20°C (Hum *et al.*, 2009) ، حتى إجراء الاختبارات الازمة عليها وقد تم اجراء البحث في مختبر كلية الطب البيطري ومختبر دائرة الصحة الحيوانية في محافظة حلب.

الأجهزة المستخدمة :

- الصاد المرصد Autoclave
- الحاضنة Incubator
- ثلاجة Refrigerator
- مجهر Microscope

الأدوات المستخدمة :

- جرة لاهوانيات Anaerobic Jar
- ورق ترشيح Filter Paper
- ميزان دقيق Scale
- سلك زرع Wire

البيانات الزراعية الجرثومية:

- ١- وسط سكريو أغار الخاص بالكامبيلوباكتر : Skirrow's Campylobacter selective medium
- ٢- مرق الثيوجلوكلات: Thioglycollate broth
- ٣- أغار الحديد والسكر الثلاثي T.S.I (Triple Sugar Iron)

المحاليل المستخدمة لإجراء الاختبارات الكيميابحوية :

- ١- كاشف حلمة البهيرات Hippurate hydrolysis testing reagent
- ٢- كاشف الاوكسیداز Oxidase Discs
- ٣- محلول بوروکسید الهيدروجين 3% : 63% (H₂O₂) Hydrogen peroxide solution
- ٤- صبغة غرام Gram stain

طريقة العمل :

تحضير زرع العينات: تم زرع العينات بعد أخذها بشكل عقيم على الأوساط الانتقائية وحضنت تحت ظروف دقيه الهواء (5% أوكسجين -10% غاز الكربون -85% نتروجين) في جرة الزرع اللاهواني باستخدام عبوات الزرع اللاهواني أو باستخدام بالشمعة وحضنت على الدرجة 37°C لمدة 5 أيام.

التعرف على المقوسة الجينية

١- الصفات المزرعية: تم فحص جميع المستعمرات النامية على المثبت الانتقائي حيث ظهرت المقوسات الجنينية تحت نوع الجنينية في العزل الأولى على شكل مستعمرات : صغيرة،نصف شفافة ، مدوره ، ناعمه وتنشر على طول اتجاه التخطيط وقد زرعت المستعمرات المشكوك بها مرة أخرى على نفس المثبت بفرض التقنية (Bryner *et al.*, 1964).

٢- صبغة غرام Gram stain: تمت الصياغة بصبغة غرام ولم تتبيل هذه الجراثيم الصبغة، حيث ظهرت بلون وردي وهو لون الصبغة البديلة مما يدل على أنها جراثيم سلبية الغرام وعند فحصها بالمجهر ظهرت على شكل الضمة أو شكل حرف S أو الشكل اللولي (Smibert, 1974).

٣- اختبار الحركة Motility of bacteria: أجري هذا الاختبار على المستعمرات النامية على المثبت الحديث حيث نقلت نقطة صغيرة من المستعمرة الجرثومية حديثة النمو إلى وسط شريحة وعلقت ببنقطتين من المحلول الفيزيولوجي ثم وضع عليها ساترة زجاجية وفحست بالتكبير المتوسط مع تقليل الإضاءة وحيث لوحظ أن هذه الجراثيم تتحرك بحركة سهمية سريعة انفاسية (Crock screw) تميز هذه الجراثيم (Kudirkiene *et al.*, 2008).

٤- الاختبارات الكيميابحوية Biochemical Tests: تهدف الاختبارات الكيميابحوية للتمييز بين المقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية والمقوسة الصائمية لأنهما أهم المقوسات المسيبة للإجهاض عند الأغذام.

• اختبار الكاتلاز **Catalase activity Test**: تم إجراء هذا الاختبار على المستعمرات الحديثة ، حيث وضعت مستعمرة جرثومية على شريحة زجاجية وأضيف إليها الماء الاوكسجيني 63% وقد لوحظ وجود الفقاعات الغازية مباشرة وهذا دليل على الإيجابية الاختبار .(Kudirkiene et al., 2008)

• اختبار الاوكسيداز **Oxidase Test** : أخذنا قرص من أقراص الكاشف الجاهزة فرشنا المستعمرة الجرثومية بواسطة سلك الزرع على القرص فلاحظنا تغير اللون إلى بنفسجي خلال 10 دقائق (Kudirkiene et al., 2008)

• اختبار إنتاج كبريت الهيدروجين **Hydrogen sulphide production H₂S**: زرعت المستعمرات في وسط أغار الحديد والسكر الثلاثي T.S.I ثم حضنت بدرجة حرارة 37 °C لمدة 48 ساعة ضمن شروط دقية الهواء ، ولم نلاحظ ظهور اللون الأسود وهذا دليل على سلبية الاختبار .(Park et al., 1984)

• حلقة الهيبورات **Hippurate Hydrolysis Test**: أخذنا أنبوب يحتوي على 0.4 مل من كاشف هيبورات الصوديوم (61%) وزرعنا المستعمرة الجرثومية وحضنت لمدة ساعتين في حمام مائي ثم أضافنا كاشف التندررين 0.2 مل وحضنت لمدة 15 دقيقة ، ولم نلاحظ ظهور اللون البنفسجي دليلاً على سلبية الاختبار (Baron et al., 1994)

• التمر على وسط الغليسين **Glycin tolerance Test**: تم تحضير وسط الثيو غليكولات غليسين حيث أخذ 1 غ غليسين و100 مل مركب ثيو غликولات وتم تحضير المستعمرة الجرثومية بدرجة حرارة 37 لـ 5 أيام تحت شروط لا هوائية ، ثم فحصت الحركة تحت المجهر ، فلوحظ أن هذه الجراثيم تتحرك بحركتها السهبية المميزة (Park et al., 1984).

RESULTS

النتائج

أظهرت الدراسة وجود 15 عزولة إيجابية (7.4%) للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية من 202 عينة تم دراستها. وكانت نسبة العزوّلات الإيجابية في محافظة طب 11 عزولة من أصل 105 نجعة مجهرة تم دراستها أي بنسبة 10.5%， كما كانت نسبة العزوّلات الإيجابية في محافظة الرقة عزولتين من أصل 29 نجعة مجهرة تم دراستها أي بنسبة 6.9%， في حين لم تجد في محافظة الحسكة أي عزولة إيجابية من 31 نجعة. أما في دير الزور فقد وجد عزولتين إيجابيتين من أصل 37 نجعة مجهرة تم دراستها أي بنسبة 5.4% وتبين من خلال مقارنة النتائج مع ظروف التربية أن 4 عزوّلات إيجابية عزلت من الأغذية المربيّة بشكل طليق، أي بنسبة 26.66%， 11 عزولة إيجابية عزلت من الأغذية المربيّة مكثفة أي بنسبة 73.33%.

التحليل الاحصائي:

حسبت الفروقات المعنوية باستخدام اختبار بيرسون مربع كاي (Pearson's chi square) وقد تم التحليل الإحصائي باستخدام نظم التحليل الأمريكي. ولم تكن هناك فروقات معنوية بين معدل الإجهاض الذي تشتهر به المقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية في كل من طب والرقة ودير الزور بينما كانت هناك فروقات معنوية واضحة بين كل من طب والحسكة (p=0.00000) وبين الرقة والحسكة (p=0.0003) أما بين الحسكة ودير الزور كانت هناك فروقات بسيطة (p=0.0011). كما وجدت فروقات معنوية واضحة بين العزوّلات الإيجابية المسجلة في قطاع التربية الطليقة (السرجية) والتربية المكثفة (p=0.00000).

DISCUSSION

المناقشة

تبين أن 15 عزولة أبدت نتائج إيجابية للمقوسة الجنينية من أصل 202 عينة أي بنسبة 7.4%. وقد كانت نتائج الدراسة متوافقة مع الدراسة التي اجريت في المنطقة الجنوبية من تركيا حيث وجد أنه من أصل 100 عينة جنين مجهر تم دراستها أي بنسبة 6.6% (Yesilmen and Gul, 2007). وقد تتوافق نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسة الحالية نظراً لقرب مناطق الدراسة بعضها. ولم تتوافق نتائج الدراسة التي اظهرت أنه من أصل 124 عينة جنين مجهر تم دراستها أي بنسبة 15 عزولة إيجابية للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية أي بنسبة 12% (Diker, 1985). وتوافقت نتائج الدراسة مع الدراسة التي بينت أنه من أصل 303 عينات لأجنة مجهرة كان هناك 20 عزولة إيجابية للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية أي بنسبة 6.6% (Kenar et al., 1990). كما تتوافقت نتائج الدراسة مع الدراسة التي وجدت أن مخاطر الإجهاض الناتج عن المقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية في الولايات المتحدة يتراوح بين 5-17% (Hansen et al., 1990). ولم تتوافق نتائج الدراسة التي وجدت أنه من أصل 110 عينات لأجنة مجهرة وجد أن هناك 5 عزوّلات إيجابية للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية أي بنسبة 4.5% (Muz et al., 1999). ولم تتوافق مع الدراسة التي تم فيها فحص 35 جنين مجهر ووجد 5 عزوّلات إيجابية للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية أي بنسبة 14.2% (Kenar and Erganis, 1990). ولم تتوافق مع الدراسة التي تم فيها عزل 4 عزوّلات إيجابية للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية من أصل 145 عينة جنين مجهر أي بنسبة 2.7% (Erdogan et al., 1993). كما أن نتائج الدراسة لم تتوافق مع الدراسة التي وجدت أن معدل الإجهاض الناتجة عن المقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية كانت 15.2% (Latinovic et al., 1985). وقد تبين من خلال الدراسة وجود 4 عزوّلات إيجابية كانت من الأغذية المربيّة بشكل طليق من أصل 15 عزولة إيجابية أي بنسبة 26.66%， بينما كان هناك 11 عزولة إيجابية من الأغذية المربيّة مكثفة من أصل 15 عزولة إيجابية أي بنسبة 73.33%. وقد كانت نتائج الدراسة متوافقة مع بحث أجري في بريطانيا وأثبتت أن المرض يكون أكثر سوءاً عندما تكون التربية عالية الكثافة (Mearns, 2007). كما اتفقت مع الدراسة التي وجدت أن التربية للأغذية بشكل مركز يؤدي إلى تلوث الحظائر أثناء مراحل الحمل المتاخرة وبالتالي يزيد فرص الإصابة بالعقوبة الجنينية تحت نوع الجنينية (Scott, 2010). واتفقت مع الدراسة التي أجريت في نيوزيلندا والتي أكدت أن الكثافة العالية للقطيع تسهم في ارتفاع معدلات إجهاض بالمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية أكثر من القطيع ذات الكثافة المنخفضة (Quinlivan and Jopp, 1982).

CONCLUSIONS

الاستنتاجات

- 1- أن النسبة العامة للعزولات الإيجابية للمقوسة الجينية تحت نوع الجنينية في هذه الدراسة بلغت / 7.4 % / حيث أن نسبة العزولات الإيجابية في محافظة حلب كانت / 10.5 % / ، وفي محافظة الرقة / 6.9 % / ، وفي محافظة دير الزور / 5.4 % / ، في حين لم تسجل في محافظة الحسكة أي نتيجة إيجابية .
- 2 - سجلت أغلب العزولات الإيجابية للمقوسة الجنينية تحت نوع الجنينية في الأغنام المرتبة بطريقة التربية المكثفة.

REFERENCES

المراجع

- Baron, E.J.; Peterson, L.R. and Finegold, B.M. (1994): Baily and scott's Diagnostic Microbiology.9th Ed. Mosby, St. Louis Baltimore.*
- Bryner, J.H.; O'Berry, P.A. and Frank, A.H. (1964): Vibrio infection of the digestive organs of cattle .Am. J. Vet. Res., 25: 1048-1050.*
- Butzler, J. (1984): Campylobacter Infection in Man and Animals. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.*
- Dasti, J.I. (2007): Identification and characterization of campylobacter jejuni factors relevant for the infection process ph.D. Thesis, George August University, Germany.*
- Diker, K.S. (1985): Studies on the identification of Campylobacter species isolated from sheep and cattle. Doga Bilim. Derg. 9, 232-240.*
- Dyre, N.W. (2008): Diagnosis of Ovine Abortion – Getting the Most Out of Your Diagnostic Laboratory. Sheep Research Report: 13-14.*
- Erdogan, I.; Gurel, A.; Tekin, C.; Uyanýk, F. and Bitgel, A. (1993): The determination and distribution of bacterial abortus in goats, cow and sheep in Thrace region. J. Pendik Vet. Microbiol. 24, 23-35.*
- Fox, J.G. (1982): Campylobacteriosis: a "new" disease in laboratory animals. Lab Anim Sci, 32: 625–637.*
- Franco, D.A. (1988): Campylobacter species: considerations for controlling a foodborne pathogen. J. Food. Prot. 51: 145–153.*
- Friedman, C.R.; Neimann, J.; Wegener, H.G. and Tauxe, R.V. (2000): Epidemiology of Campylobacter jejuni infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I., Blaser M. J. Campylobacter. Washington: ASM Press; p. 121–39.*
- Grogono-Thomas, R.; Dworkin, J.; Blaser, M.J. and Newell, D.G. (2000): Roles of the surface layer proteins of Campylobacter fetus subsp. fetus in ovine abortion. Infect Immun. 68: 1687-1691.*
- Hansen, D.E.; Hedstrom, O.R.; Sonn, R.J. and Synder, P.S. (1990): Efficacy of a vaccine to prevent Chlamydia or Campylobacter induced abortions in ewes. JAVMA, 196, 731-734.*
- Hum, S.; Hornitzky, M. and Berg, T. (2009): Ovine Campylobacteriosis. Elizabeth Macarthur Agricultural Institute. Australia: 1-8.*
- Jensen, R.; Miller, V.A. and Molello, J.A. (1961): Placental pathology of sheep with vibriosis. American journal of veterinary Research22 (87)169-185.*
- Justin, S. and Luther, Ph.D. (2006): Abortions in Sheep Causes, Control and Prevention. NDSU Extension Sheep Specialis, AS-1317.*
- Kenar, B. and Erganis, O. (1990): Isolation and antibiotic susceptibility of Campylobacter spp. in aborted ovine fetuses in the central Black Sea. Veterinarium .5, 4-11.*
- Kenar, B.; Erganis O.; Kaya O. and Guler L. (1990): Bacteriological and serological survey on brucella, campylobacter, salmonella and chlamydia infections caused to sheep abortion in Konya region (central Anatolia) in Turkey. Veterinarium, 1, 17-20 (in Turkish).*
- Kudirkiene, A.; Malakauskas, A.; Serniene, L. and Malakauskas, M. (2008): Isolation and identifaction of thermophilic Campylobacter ssp. by PCR-RFLP in broiler flocks. Veterinarija IR Zootechnik, A. 42(64): 44-46.*
- Latinović, V.; Popovic, M. and Nevjestic, A. (1985): Prvi slucajevi izolacije bakterija roda Campylobacter kod goveda i ovaca u Srbich. Veterinaria, Sarajevo. 34, 367-375.*
- Mc fadyean, J. and Stockman, S. (1913): Report of the Departmental committee appointed by the board of the Agriculture and Fisheries to inquire into Epizootic Abortion.part3.Abortion in sheep. London: HMSO.*
- Mearns, R. (2007): Campylobateriosis. pages131-132 In: Diseases of sheep ed, I. D. Aitken. Blackwell publishing, Oxford, U.K.*
- Muz, A.; Ertas, H.B.; Ongor, H.; Gulcu, H.B.; Ozer, H.; Eroksuz, H.; Dabak, M.; Basbug, O. and Kalender, H. (1999): Bacteriologic, serologic and pathologic studies on aborted cases of goats and sheep in Elazýd and it.s vicinity. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 23, 177-188.*

- Park, C.E.; Smibert, R.M.; Blaser, M.J.; Vanderzant, C.; Stern, N. (1984): Campylobacter in: "Compendium of methodes for the Microbiological examination of food" 2nd Ed. Speck. M(ed) American public Health Association, Washington, D.C.
- Quinliven, T.D. and Jopp, A.J. (1982): A survey on the incidence and cause of ovine abortion in Hawkes Bay. Newzealand veterinary journal 30(5)65-68.
- Scott, ph. (2010): Abortion in ewes. the National Animal Disease Information Service (Nadis). [Internet]. Available at: www. nadis. org. UK.
- Sebald, M. and Veron, M. (1963): Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 105: 897-910.
- Skirrow, M.B. (1977): Campylobacter enteritis: a "new" disease. Br. Med. J. 2: 9-11. Smith, T.; Orcutt, M.L. (1927). Vibrios from calves and their serological relationto Vibirio fetus. J. Exp. Med. 45: 391-397.
- Smibert, R.M. (1974): Genus II. Campylobacter Sebald and Veron 1963, 907, p. 207-212. In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Smith, T. (1918): Spirilla associated with disease of the fetal membranes in cattle (infectious abortion). J. Exp. Med. 28:701-719.
- Yesilmen, S. and Gul, K. (2007): Isolation, identification and antibiotic susceptibility of campylobacter ssp. in aborted sheep fetuses medycyna wet.63 (10).