

Prevalência de *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas em clínicas particulares em Caxias do Sul/RS

Prevalence of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women assisted in clinical individuals in Caxias do Sul/RS

Géssica Capellin¹, Adriana Dalpicolli Rodrigues², Giovana Vera Bortolini³

1 Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário da Serra Gaúcha (FSG), Caxias do Sul, RS, Brasil. 2 Mestre em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul (UCS), Analista Científica no Laboratório Alfa LTDA, Caxias do Sul, RS, Brasil. 3 Mestre em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul (UCS), Microbiologista no Laboratório Sabin, Distrito Federal, Brasil.

Resumo

Introdução: A colonização por *Streptococcus agalactiae* em pacientes durante a gestação é um fator considerado grave para o recém-nascido. Essa bactéria em contato com o neonato é capaz de causar infecções neonatais graves, como sepse, pneumonia e meningite, principalmente em situações de parto prematuro e ruptura de membranas, quando não se tem tempo hábil para a realização do diagnóstico de colonização. **Objetivo:** avaliar a prevalência de colonização por *S. agalactiae* em gestantes atendidas em clínicas particulares no município de Caxias do Sul. **Métodos:** trata-se de um estudo transversal e retrospectivo realizado entre janeiro de 2015 e janeiro de 2016, no qual foram analisados prontuários de pacientes gestantes. **Resultados:** Foram avaliados 174 prontuários de pacientes gestantes, nos quais 6,90% das pacientes apresentaram culturas positivas para *S. agalactiae* e 93,10% foram negativas. Para as pacientes positivas, observou-se que o antibiótico mais frequentemente utilizado foi a penicilina. Avaliaram-se, também, casos de infecções do trato urinário e observou-se que cinco gestantes, também colonizadas por *S. agalactiae*, tiveram infecção urinária, todas por *Escherichia coli*. **Conclusões:** O número de resultados positivos para *S. agalactiae* na pesquisa realizada foi baixo. As pacientes avaliadas não apresentaram complicações gestacionais ou para o conceito provavelmente devido às medidas profiláticas realizadas. Correlacionando o resultado deste trabalho com outros realizados no Brasil, percebeu-se a deficiência de estudos mais completos acerca dessa temática, os quais levam em consideração a idade gestacional, o sítio de coleta, o método utilizado para diagnóstico, bem como a utilização de metodologias confirmatórias.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*. Gestantes. Recém-nascidos. Profilaxia.

Abstract

Introduction: *Streptococcus agalactiae* colonization in patients during pregnancy is a serious factor for the newborn. This bacterium in contact with the neonate is capable of causing serious neonatal infections, such as sepsis, pneumonia and meningitis, especially in situations of preterm birth and membrane rupture when there is no time to perform the colonization diagnosis. **Objective:** to evaluate the prevalence of *S. agalactiae* colonization in pregnant attended at private clinics in the city of Caxias do Sul. **Methods:** a cross-sectional and retrospective study was carried out between January 2015 and January 2016. **Results:** 174 medical records of pregnant women were evaluated, 6.90% of the patients presented *S. agalactiae* positive cultures and 93.10% were negative. For the positive patients it was observed that the most frequently used antibiotic was penicillin. We also evaluated cases of urinary tract infections and it was observed that five pregnant, also *S. agalactiae* colonized, had urinary infection, all of them due to *Escherichia coli*. **Conclusion:** The number of positive results for *S. agalactiae* in the research performed was low. The patients evaluated did not present gestational complications or for the concept probably due to the prophylactic measures performed. Correlating the results of this study with other studies carried out in Brazil, we noticed the lack of more complete studies about this subject, taking into account gestational age, collection site and method diagnosis used as well as the use of confirmatory methodologies.

Key words: *Streptococcus agalactiae*. Pregnant. Newborn. Prophylaxis methodologies.

INTRODUÇÃO

Estreptococos são bactérias Gram-positivas que se apresentam em forma de diplococos ou cadeias, podendo ser classificados nos grupos A, B, C e D. Lancefield descobriu que a maioria dos estreptococos possuía um componente antigênico característico na parede celular e denominou-o de Carboidrato C. Com esta descoberta, foi possível classificar estes estreptococos β-Hemolíticos (EBH) em grupos sorológicos, em que foram organizados por letras do alfabeto (A, B, C e D). Além de criar a base para estabelecer a grupagem sorológica dos EBH, conseguiu reconhecer a proteína M, antígeno de superfície

responsável pela resistência fagocitária. Essas bactérias fazem parte de um grupo heterogêneo, no qual nenhum sistema de classificação é adequado, *Streptococcus pyogenis* (grupo A), *Streptococcus agalactiae* (grupo B) e *Enterococcus* (grupo D), e caracterizam-se por combinação: o crescimento das colônias, composição antigênica de substâncias da parede celular e ainda por reações químicas¹.

Os Estreptococos são membros da microbiota humana normal, mas podem estar associados a doenças graves, como meningite,

Correspondência: Adriana Dalpicolli Rodrigues. Laboratório Alfa LTDA, Caxias do Sul, RS, Brasil. E-mail: adry.dr@gmail.com

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 19 Dez 2017; Revisado em: 11 Mar 2018; 12 Abr 2018; Aceito em: 13 Abr 2018

sepsis, pneumonia entre outras^{1,2}. Entre as espécies estudadas, o *Streptococcus agalactiae* é classificado no grupo B, sendo capaz de produzir zonas de hemólise maiores que suas colônias e, por isso, denomina-se β-hemolítico¹. A beta-hemólise é causada por uma proteína chamada hemolisina, que é capaz de formar poros e de lisar as células do hospedeiro, sugerindo que essa proteína tenha um papel como fator de virulência nas infecções causadas pelo *Streptococcus agalactiae*².

O *S. agalactiae* tem grande importância para mulheres durante a gestação, pois é responsável por significativas complicações de saúde para os recém-nascidos. Desde o ano de 1970, tem sido associado com infecções perinatais, uma vez que a presença desta bactéria durante a gestação, principalmente na hora do parto ou na ruptura das membranas amnióticas, tem grande risco de transmissão para o feto, podendo desencadear graves complicações como sepsis, pneumonia, síndrome da angústia respiratória e meningite³.

De acordo com Função 2013, estima-se que 15 a 40% das gestantes no Brasil são portadoras do *S. agalactiae*, e quase 75% dos recém-nascidos expostos a este micro-organismo são colonizados antes ou após o parto, sem que apresente o desenvolvimento de doenças neonatais e infecções⁴. Devido ao perfil da colonização ser transitória, a realização do exame é recomendada a partir da 35ª até a 37ª semana de gestação⁵. Os sintomas para a identificação dessas doenças nos recém-nascidos vêm logo após o nascimento, momento em que se observa dificuldade respiratória em 35 a 55% dos pacientes, 25 a 40% deles têm o quadro de sepsis e choque séptico evoluído nas primeiras 24h, e há ocorrência de meningite em 5 a 15% dos recém-nascidos, os quais podem ir a óbito até o segundo dia de vida. Em uma segunda forma de infecção considerada tardia, pode acometer pacientes até doze dias de vida⁵.

A profilaxia mais utilizada para evitar a transmissão vertical desta bactéria é a penicilina⁶. Segundo recomendações do Centers for Disease Control and Prevention – (CDC), este antibiótico somente é utilizado quando as pacientes colonizadas apresentarem trabalho de parto prematuro antes da 37ª semana de gestação, ruptura de membranas amnióticas superior a 18 horas, e também quando a paciente tiver histórico de colonização/infecção por *S. agalactiae*⁶. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a prevalência de colonização por *S. agalactiae* em gestantes atendidas em clínicas particulares no município de Caxias do Sul, a segunda maior cidade do estado do Rio Grande do Sul em habitantes e importância econômica.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal e retrospectivo, realizado entre janeiro de 2015 e janeiro de 2016, em que foram analisados prontuários de pacientes gestantes em duas clínicas particulares de Caxias do Sul. Os critérios de inclusão utilizados para constituir a amostra foram: prontuários de gestantes que realizaram o pré-natal com exame para pesquisa de *S.*

agalactiae. Os critérios de exclusão foram: prontuários de gestantes sem o pré-natal e/ou exame específico para detecção do micro-organismo.

Como procedimento médico padrão, a paciente recebeu a requisição médica para a pesquisa de *S. agalactiae*, fez o exame no laboratório de seu interesse e voltou à clínica para a consulta, onde o resultado foi avaliado pelo médico e anotado no prontuário. Todos os laboratórios escolhidos pelas pacientes realizam cultura em meio seletivo para a pesquisa dessa bactéria. Desse modo, foram utilizadas as seguintes variáveis nos prontuários: se a paciente estava gestante no período descrito, a idade da paciente e se a paciente apresentava exame positivo ou negativo para a colonização/infecção por *S. agalactiae*. O status sociocultural das pacientes não foi avaliado. Entretanto, sabe-se que o atendimento foi realizado de modo particular ou por convênio com planos de saúde, não sendo atendimentos da rede pública da cidade.

As duas clínicas particulares que participaram da pesquisa assinaram a Carta de Anuência, e a coleta de dados somente teve início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário da Serra Gaúcha sob o parecer número 1.589.697, segundo as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. 466/12) do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS

Durante o período de estudo, janeiro de 2015 a janeiro de 2016, foram analisados 200 prontuários. No decorrer da pesquisa, 26 prontuários foram excluídos, restando 174 prontuários aptos a participar. Um total de 87% das pacientes atendidas no período estabelecido para a pesquisa aderiu a essa prática profilática. A faixa de idade das pacientes estudadas é de 21 a 41 anos, a média de idade é de $32 \pm 5,6$ anos.

Do grupo selecionado, 12 (6,90%) apresentaram cultura positiva para *Streptococcus agalactiae* do grupo B, e 162 (93,10%) foram negativas. Outras técnicas, como métodos moleculares, não foram realizadas de acordo com as informações disponíveis nos prontuários. Para verificar o estado de colonização, transitória ou persistente, foi avaliado o período gestacional em que as pacientes se encontravam na solicitação e na coleta do exame, e observou-se que elas se encontravam na 36ª semana.

Para as pacientes de cultura positiva, observou-se que o antibiótico mais frequentemente utilizado foi a penicilina, pois onze pacientes fizeram uso dela, e uma só paciente fez uso de ampicilina. Além disso, quando se verificaram possíveis complicações em neonatos bem como a necessidade de Unidade de Terapia Intensiva (UTI's), percebeu-se que, no presente estudo, não houve intercorrências significativas que exigissem cuidados especiais.

Por fim, avaliaram-se situações de infecção urinária pela bactéria *Streptococcus agalactiae*, bem como também por outros agentes microbianos, e observou-se que cinco pacientes

colonizadas por *S. agalactiae* apresentaram, em alguma fase da gestação, infecção urinária, todas por *Echerichia coli*.

DISCUSSÃO

A prevalência da colonização por *S. agalactiae* neste estudo foi de 6,90%, resultado inferior a dados nacionais, os quais mostram que, no Brasil, de acordo com Costa (2010), a porcentagem varia de 10 a 30%⁷. No entanto, em um estudo realizado no Ceará no ano de 2011 com 213 gestantes, a prevalência de colonização foi de 4,2%, o que corrobora o presente estudo⁸. Somando-se a isso, em Brasília, no ano de 2012, foram avaliadas 74 gestantes, e a prevalência foi de 5,9%⁹, resultado semelhante ao encontrado.

Por outro lado, em uma pesquisa realizada no estado de Santa Catarina, em Florianópolis, no ano de 2015, foram avaliadas 1425 gestantes, 235 (16,5%) foram positivas para o *S. agalactiae* (EGB)¹⁰. Estudos realizados no estado de São Paulo, em 2010 e 2013 respectivamente, mostram que a porcentagem para EGB positivo foi de 25,4% e 17,4%^{11,4}, tendo o primeiro estudo valor muito próximo ao observado também no Paraná (28,4%)¹². Ainda, um estudo realizado no Nordeste mostrou que 20,4% das 201 gestantes estavam colonizadas na 39ª semana de gestação¹³.

Com relação a estudos realizados em outros países, pode-se observar que as porcentagens pouco variam das pesquisas realizadas no Brasil. Nos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com Norcia et al (2014), a colonização é de 20%¹⁴; já um estudo realizado no Chile em 2014, com 1.181 gestantes, 167 foram positivas para EGB com prevalência de 14,4%¹⁵.

Como observado, existe uma grande variabilidade de resultados acerca da prevalência de colonização por *S. agalactiae*. Verifica-se, ainda, um número significativo de estudos mostrando que a prevalência de *S. agalactiae* positivo é menor de 20%^{4,8,9,13}.

É importante considerar a idade gestacional em que a paciente se encontrava no momento da coleta. O CDC preconiza que o exame seja realizado entre a 35ª e a 37ª semana de gestação; neste estudo, as gestantes incluídas realizaram o exame com 36ª. No estudo realizado no Ceará, as pacientes gestantes incluídas foram a partir da 20ª semana de gestação. As culturas devem ser realizadas em curto prazo, pois se trata de uma colonização que pode ser transitória ou intermitente, ou seja, a colonização no início da gravidez pode não se manter até o final da gravidez⁸.

Segundo o CDC, para se ter uma pesquisa satisfatória, além da idade gestacional, também devem ser levados em consideração os sítios de coleta e a qualidade da amostra. Neste estudo, apenas avaliou-se a idade gestacional como descrito acima⁶.

O método padrão ouro para identificação ainda é o teste de CAMP, que consiste na identificação de cepas de *S. agalactiae* (grupo B), uma vez que estas cepas produzem o fator Christie,

Atkins e Munch-Petersen – (CAMP) que atua, sinergicamente, com a β -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* em ágar sangue, causando a lise dos eritrócitos e formando a ponta de uma flecha². Outros métodos também passaram a ser utilizados ao longo do tempo. O caldo granada é considerado uma opção alternativa, uma vez que combina o fácil manuseio com uma boa sensibilidade. É específico para detecção de EGB, e seu princípio baseia-se na formação de uma pigmentação alaranjada que diferencia o *S. agalactiae* de outros micro-organismos. A coloração se deve ao próprio micro-organismo, é muito específica, e não ocorre na presença de outros micro-organismos¹⁶. Após a incubação realizada, as estirpes beta-hemolíticas irão produzir coloração laranja viva. Para detectar estirpes pigmentadas, os meios devem ser lidos em uma superfície branca. Qualquer intensidade da pigmentação cor-de-laranja é considerada positiva^{16,17}.

Um estudo realizado em Cuba no ano de 2014 mostra que o método do caldo granada tem a sensibilidade de 60 a 71% e uma especificidade de 94,57%¹⁷. Em um trabalho realizado em Chapecó/RS, no ano de 2016, todas as amostras que foram inoculadas no caldo granada também foram semeadas em ágar sangue para o teste de CAMP. Das 93 amostras analisadas, 31% (29) foram positivas e 69% (64) negativas, e destas, somente 21 amostras foram positivas no caldo granada; enquanto apenas 8 foram positivas no teste de CAMP. Por isso, a importância da utilização de outro método, pois, segundo a recomendação do CDC, todas as amostras negativas no caldo granada devem ser semeadas em outro meio, a fim de se ter a confirmação do resultado^{17,6}.

Comparando-se com demais estudos da literatura, considerou-se que a prevalência de infecção por EGB no presente estudo foi baixa; isso pode ser justificado, principalmente, pelas diferenças metodológicas, visto que alguns laboratórios preferem utilizar apenas o método do caldo granada ou outros meios cromogênicos não específicos, pela sensibilidade e praticidade, mas deixam de realizar a confirmação com o teste de CAMP. Seja por sítio de coleta e qualidade da amostra, a coleta deve ser feita, principalmente, nas regiões vaginal e anal. Quando se deixa de fazer a coleta nestes sítios, ou ela não é realizada adequadamente, o resultado do teste pode ser comprometido. A orientação das pacientes para a coleta também é muito importante para o sucesso da pesquisa deste agente infeccioso.

A população estudada também pode ter influenciado no resultado. Pacientes de clínicas particulares podem ser mais instruídas, ter mais conhecimento sobre métodos de higiene e sobre os agentes causadores de infecção que possam prejudicar sua gestação e seu conceito, sendo assim uma limitação do estudo.

Outro fator importante a ser destacado é quanto à idade gestacional, uma vez que influencia muito nos resultados deste teste, como descrito acima, pacientes em idade gestacional abaixo de 35 semanas não estão aptas a realizar este exame, pois a flora vaginal pode ser transitória. De acordo com o CDC,

para pacientes gestantes colonizadas por *S. agalactiae*, alguns antibióticos são utilizados intraparto para a profilaxia. Neste estudo, a Penicilina teve a maior frequência e, em segundo, foi a Ampicilina. Para pacientes alérgicas a Penicilina e Ampicilina preconiza-se a administração de Cefazolina, Clindamicina e Vancomicina⁶. O tratamento profilático das gestantes que apresentaram resultado positivo foi um fator importante que pode ter sido o principal para a não ocorrência de complicações tanto para a gestante quanto para o feto.

Infecções do trato urinário (ITU) são comuns no sexo feminino, mas, durante a gestação, as mulheres estão predispostas a ter infecção nesta região devido à alteração de sua anatomia e fisiologia. Este tipo de patologia pode causar complicações ao feto, tais como parto prematuro e ruptura de membranas amnióticas. A maior parte dos casos de ITU durante a gestação são causados por *Escherichia coli*.^{17,18,20} Neste estudo, pode-se observar a correlação entre pacientes que tiveram cultura

positiva para *S. agalactiae* e também foram positivas para *E. coli*^{18,19}. Das 12 (6,90%) pacientes que foram positivas para EGB, 5 (41,67%) tiveram infecção no trato urinário por *E. coli*.

Com este trabalho, foi possível avaliar a prevalência de colonização por *S. agalactiae* nas gestantes avaliadas em duas clínicas particulares de Caxias do Sul. As pacientes não apresentaram complicações gestacionais e nem o conceito, provavelmente devido ao baixo percentual (6,90%) de casos positivos e as medidas profiláticas realizadas, reforçando a necessidade da realização da pesquisa dessa bactéria em gestantes para evitar as complicações citadas na literatura. E, por fim, correlacionando-se este trabalho com outros realizados no Brasil, percebeu-se a deficiência de estudos mais completos, que levem em consideração a idade gestacional, o sítio de coleta e o método utilizado, a utilização de metodologias confirmatórias, bem como os estudos que façam uma comparação entre metodologias de pesquisa dessa bactéria.

REFERÊNCIAS

- Morse SA, Butel JS, Brooks GF. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26. ed. Rio de Janeiro: Artmed; 2014.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, et al. Koneman, Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Oliveira V, Moraes O. Solicitar ou não cultura para estreptococo do grupo B no final da gestação?. *Femina*. 2009; 37(7): 361-365.
- Função J, Narchi N. Pesquisa do Estreptococo do grupo B em Gestantes da zona Leste de São Paulo. *Rev. esc. enferm. USP*. 2013 Fev; 47(1): 22-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342013000100003>.
- Zardeto G, Guillen F, Camacho D. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes como rotina laboratorial de exames pré-natais. *Rev. Uningá*. 2014 Out-Dez; 42: 77-84.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR*. 2010; 59(RR10): 1-32.
- Costa NDL, Carvalho M, Pone SM, Gomes SC Júnior. Gestantes colonizadas pelo Streptococcus do grupo B e seus recém-nascidos: análise crítica da conduta adotada no Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz. *Revista Paul Pediatría*. 2010; 28(2): 155-61.
- Linhares J, Cavalcane P, Vasconcelos J, Saraiva T, Ribeiro A, Siqueira T, et al. Prevalência por *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas em maternidade do Ceará, no Brasil, correlacionando com os resultados perinatais. Sobral, CE. *Rev. Bras Ginecol Obstet*. 2011; 33(12): 395-400.
- Souza NT, Magalhães HL, Vogt MF, Zaconeta AC, Wanderley MM, Martins P, et al. Detecção da colonização por *Streptococcus agalactiae* e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos em gestantes atendidas no Hospital Universitário de Brasília. *Brasília Med*. 2012; 49(1):18-26.
- Nunes RD, Cesconeto MC, Siqueira IR. Avaliação da Prevalência e dos Fatores Associados a Colonização por Streptococcus Beta Hemolítico na Gestação. *Arq. Catarin Med*. Jul-Sep 2015; 44(3): 53-65.
- Marconi C, Rochetti T, Rall V, Carvalho L, Borges V, Silva M. Detection of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women by using combined swab cultures: cross-sectional prevalence study. *Botucatu, SP. Sao Paulo Med J*. 2010; 128(2):60-2. English.
- Melo SCCS, Costa AB, Silva FTR, Silva NMMG, Tashima CM, Cardoso RF, Pádua RAF, Previdelli I, Carvalho MDB, Peloso SM. Prevalence of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women from the 18th Health Region of Paraná State. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 2018; 60,e2.
- Costa A, Lamy F, Chein M, Brito L, Lamy Z, Andrade K. Prevalência de colonização por estreptococos do Grupo B em Gestantes em maternidade Pública. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2008; 30(6):274-80.
- Norcia B, Balei R, Morais U, Reda C, Capobiango J. Prevenção da doença invasiva neonatal precoce pelo *Streptococcus agalactiae*: experiência em um hospital escola. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2014 Jan-Jun; 35(1):105-114.
- Abarsúa F, Argomedeo C, Meissner A, Díaz T, Garrido P, Fariña S, et al. [Prevalência de portación vaginal-anal de *Streptococcus agalactiae* em el tercer trimestre de gestación y susceptibilidad a macrólidos y lincosamidas, en mujeres embarazadas de Clínica Alemana Temuco, Chile]. *Revista Chilena de Infectología*. 2014; 31 (3): 305-308. Espanhol.
- Vassoler R, Catapan K, Jalkuski MR. Colonização pelo Streptococcus beta hemolítico do grupo B em gestantes atendidas em um Laboratório Chapecó, SC. *Perspectiva*. 2016 Mar; 40(149): 131-138.
- Cruz A, Peraza G, Caballero R. Colonización vaginal/rectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de Melena del Sur, Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 2014 Sep-Dic; 66(3):415-423.
- Ramos GC, Laurentino AP, Fochesatto S, Francisquetti FA, Rodrigues AD. Prevalência de infecção do trato urinário em gestantes em uma cidade no sul do Brasil. *Saúde (Santa Maria)*. 2016 Jan-Jun; 42(1):173-178. doi: <http://dx.doi.org/10.5902/2236583420173>.
- Figueiró E, Bispo A, Vasconcelos M, Maia M, Celestino F. Infecção do trato urinário na gravidez: aspectos atuais. *Femina*. 2009 Mar; 37(3):165-171.
- Gomes I, Metello J, Freitas B, Diogo J. Infecções urinárias na gravidez. *Acta Obstet Ginecol Port*. 2017 Out;11(4):248-254.

Como citar este artigo/How to cite this article:

Capellin G, Rodrigues AD, Bortolini GV. Prevalência de Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas em clínicas particulares em Caxias do Sul/RS. *J Health Biol Sci*. 2018 Jul-Set; 6(3):265-268.