

食品中微生物之檢驗方法－A 型肝炎病毒之檢驗(草案)
Methods of Test for Food Microorganisms- Test of Hepatitis A virus

1. 適用範圍：本方法適用於貝類、飲用水及蔬果中 A 型肝炎病毒之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經 RNA 萃取後，以反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、RT-PCR 試劑配製及 PCR 等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉汙染。
 - 2.2. 裝置^(註 1)
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.3. 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。
 - 2.2.4. 冷凍櫃：能維持 $-30\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。
 - 2.2.5. 超低溫冷凍櫃：能維持 $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。
 - 2.2.6. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.2.7. 天平：最大稱重量為 2000 g 者，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 120 g 者，靈敏度為 1 mg。
 - 2.2.8. 振盪器。
 - 2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.10. 紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。
 - 2.2.11. 微波爐或加熱板(Hot plate)。
 - 2.2.12. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp[®] PCR System 9700，或同級品。
 - 2.2.13. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
 - 2.2.14. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能，且能維持內部溫度溫差 0.5°C 以內者。
 - 2.2.15. 微量冷凍離心機(Microrefrigerated centrifuge)：可供各式離心管離心使用，可達 $20000 \times g$ 以上，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.16. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.17. 抽氣幫浦。
 - 2.2.18. 玻璃過濾器組：直徑為 47 mm 且可滅菌者。

註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

2.3.1. 病毒萃取用：氯化鈉、氯化鉀、甘胺酸(glycine)、氫氧化鈉、無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000)、聚乙二醇 8000 (polyethylene glycol 8000, PEG 8000)、氯仿、丁醇、硫酸、鹽酸、硼酸、氯化鎂($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$)及三羥甲基胺基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)均採試藥特級，牛肉萃取物(beef extract powder)及蛋白胨(peptone)均採微生物級，果膠酶(pectinase from *Aspergillus niger* or *Aspergillus aculeatus*)採分子生物級。

2.3.2. 病毒 RNA 抽取用：適用於病毒 RNA 抽取之市售套組，針對蔬果檢體，採用大體積檢液(1 mL)病毒 RNA 抽取之市售套組。

2.3.3. 病毒 RNA 處理用：去氧核糖核酸水解酶 I (DNase I) 5 U/ μL 。

2.3.4. 反轉錄反應用：適用於病毒 RNA 反轉錄之市售套組，內含反轉錄酶(reverse transcriptase)、5 倍緩衝溶液、10 mM 去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、隨機引子(random-primer)、0.1 M 二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)及核糖核酸水解酶抑制劑(RNase inhibitor)。

2.3.5. 聚合酶鏈反應用：

2.3.5.1. DNA 聚合酶：*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)，內附 10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂)，或同級品。

2.3.5.2. 去氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 溶液：含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。

2.3.5.3. A 型肝炎病毒

(標的區域：5 端非轉譯區)

引子 F：HAV68 5' - TCACCGCCGTTTGCCTAG -3'

引子 R：HAV240 5' - GGAGAGCCCTGGAAGAAAG-3'

PCR 增幅產物大小 173 bp

(標的區域：蛋白質外殼結構基因 VP1/P2A)

引子 F：VP1-4 5- CGTTGCTTCCCATGTCAGAG -3'

引子 R：VP1-5 5- GACCTTCCCATAAACTTGTAG -3'

PCR 增幅產物大小 369 bp

2.3.6. 電泳用試藥：乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、溴化乙錠(ethidium bromide)、三羥甲基胺基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)、甘油、硼酸及瓊膠(agarose)均採用分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質(DNA molecular weight marker): 100 bp DNA ladder marker。

2.3.7. 對照用物質：A 型肝炎病毒。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 可調式微量分注器：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。

2.4.3. 吸管或自動吸管/吸管尖：已滅菌。1mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度、5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。

2.4.4. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

2.4.5. 微量離心管：200 μL、1.5 mL、2 mL。

2.4.6. 離心管：50 mL，PP 材質。

2.4.7. 離心過濾管：15 mL，篩選分子量大於 10⁵ 道爾頓(dalton)之物質。

2.4.8. 無菌袋、附濾網之無菌袋(400 mL)。

2.4.9. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。

2.4.10. 無菌濾膜：孔徑 0.22 μm 之親水性醋酸纖維膜。

2.4.11. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL 及 96 孔反應盤。

2.4.12. 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。

註 2：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 及 RNase 污染。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. 磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate buffered saline, PBS)：

稱取氯化鈉 76.5 g、無水磷酸氫二鈉 7.2 g 及磷酸二氫鉀 2.1 g，溶於去離子水 1000 mL，即為 10 倍 PBS 緩衝溶液。取 10 倍 PBS 緩衝溶液 100 mL，加去離子水使成 1000 mL，以 121°C 滅菌 15

- 分鐘，最終 pH 值為 7.4。
- 2.5.2 聚乙二醇 6000-氯化鈉(PEG 6000-氯化鈉)溶液：
稱取氯化鈉 26.4 g，以去離子水溶解使成 380 mL，再加入聚乙二醇 6000 120 g，混勻，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.5.3. 氯仿-丁醇溶液：
分別取等體積的氯仿與丁醇，置於褐色瓶，混合均勻。
- 2.5.4. 50 mM 硫酸溶液：
量取硫酸 1.39 mL，緩緩加入無菌去離子水 200 mL 中，再加無菌去離子水使成 500 mL。
- 2.5.5. 0.5 mM 硫酸溶液：
量取 50 mM 硫酸溶液以去離子水稀釋 100 倍。
- 2.5.6. 1 mM 氫氧化鈉溶液：
稱取氫氧化鈉 4 g，加無菌去離子水 80 mL 溶解使成 100 mL，再以無菌去離子水稀釋 1000 倍。
- 2.5.7. 6 N 鹽酸溶液：
量取鹽酸 50 mL，緩緩加入無菌去離子水使成 100 mL。
- 2.5.8. 100 倍三羥甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸溶液：
稱取三羥甲基氨基甲烷 12.1 g 及乙二胺四乙酸 2.9 g，以去離子水 80 mL 溶解，再以 6 N 鹽酸溶液調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 100 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘。或使用市售 100 倍無菌三羥甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸溶液。
- 2.5.9. 0.5M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液：
稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加去離子水 800 mL 溶解，再加入氫氧化鈉 20 g，調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 1000 mL。
- 2.5.10. 蛋白胨緩衝溶液(Buffer peptone water, BPW)：
稱取蛋白胨 10 g、氯化鈉 5 g、無水磷酸氫二鈉 3.5 g 及磷酸二氫鉀 1.5 g，溶於去離子水使成 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。
- 2.5.11. 三羥甲基氨基甲烷-甘胺酸-牛肉萃取物緩衝溶液(Tris-glycine-beef extract buffer, TGBE)：
稱取三羥甲基氨基甲烷 12.1 g、甘胺酸 3.8 g 及牛肉萃取物 10 g，溶於去離子水使成 1000 mL，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 9.5 ± 0.2 。
- 2.5.12. 含果膠酶之 TGBE 緩衝溶液：
取 TGBE 緩衝溶液 100 mL，加入果膠酶 *Aspergillus niger* 75 unit 或 *Aspergillus aculeatus* 2850 nit，臨用時配製。
- 2.5.13. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA)緩衝溶液：

稱取三羥甲基胺基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加入 0.5M EDTA 溶液 20 mL，再加去離子水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液，或使用市售 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以去離子水將 5 倍 TBE 緩衝溶液稀釋為 0.5 倍，作為 0.5 倍 TBE 緩衝溶液。

2.5.14. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)：

稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加入甘油 30 mL，再加入無菌去離子水使成 100 mL，置於 4°C 冰箱貯存備用。

2.5.15. 2.5% 膠片：

稱取瓊膠 2.5 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，冷卻至約 50°C 時，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

2.5.16. 膠片染液：

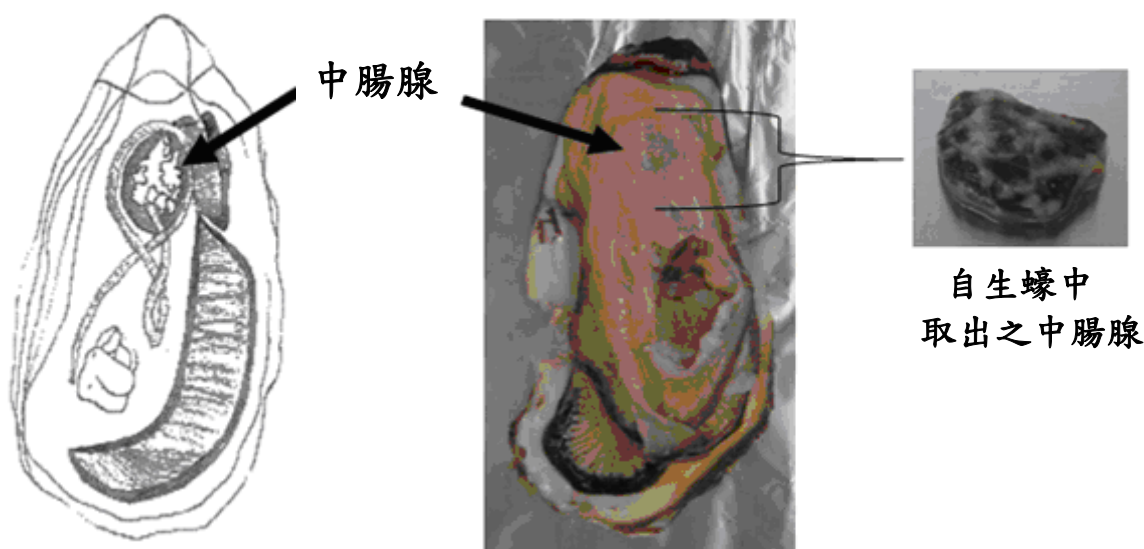
稱取溴化乙錠 0.1 g，加去離子水 10 mL 溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以去離子水稀釋成 1 µg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.6. 病毒之濃縮

2.6.1. 貝類檢體

2.6.1.1. 貝類檢體處理：

貝類外殼用已滅菌小刀或鑷子打開，取出肉質部分並將外套膜及白色組織去除，白色組織儘可能剔除乾淨，留下中腸腺部分，供作檢體，如圖一。



圖一、生蠔中中腸腺相對位置圖

2.6.1.2. 中腸腺前處理：

取中腸腺 1.5 g，置於 50 mL 離心管，加入磷酸鹽緩衝溶液 10 mL，將離心管置於冰上，以均質棒進行 2 段式研磨，每段各 30 秒；續加入氯仿-丁醇溶液 6 mL，持續均質 30 秒，再以磷酸鹽緩衝溶液 3 mL 沖洗殘留於均質棒上之檢體。將研磨後之檢體於 4°C 旋轉混合均勻 1 小時，以轉速 12000×g 離心 20 分鐘，取上層液。

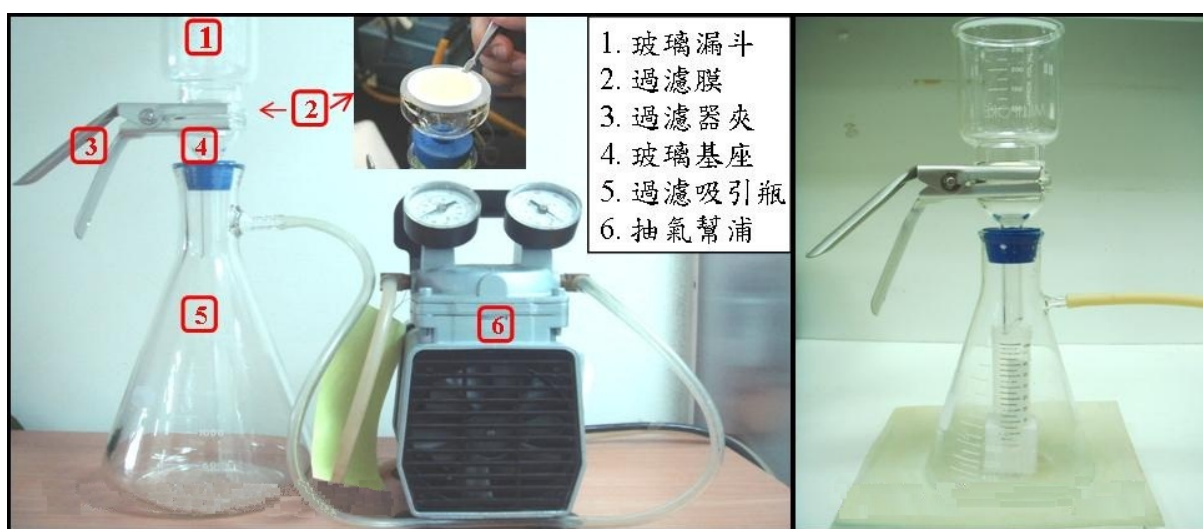
2.6.1.3. PEG 6000 濃縮處理：

加 PEG6000-氯化鈉溶液 10.5 mL 至 2.6.1.2. 節上層液中，充份混勻，混合液於 4°C 持續旋轉混合均勻過夜。混合液於 4°C 以 12000×g 以上之轉速進行離心 20 分鐘，去除上清液，續以市售套組操作抽取病毒 RNA。

2.6.2. 飲用水檢體

2.6.2.1. 大量檢體之病毒濃縮：

取檢體 100~1000 mL，加入氯化鎂(最終濃度 25 mM)，設置一水檢體過濾裝置(如圖二)，將檢體加入過濾漏斗中，經由真空抽氣，將檢體通過無菌濾膜，以 0.5 mM 硫酸溶液 200 mL 沖洗濾膜，棄沖洗液，置換過濾吸引瓶成檢液收集裝置(如圖三)，再以 1 mM 氫氧化鈉溶液 10 mL 洗滌濾膜，收集洗滌液至檢液收集裝置內之無菌離心管中，該離心管預先加入 50 mM 硫酸溶液 0.1 mL 及 100 倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液 0.1 mL，取出離心管，將洗滌液倒入濃縮離心管過濾槽中，於 4°C 以 3000×g 離心 20~30 分鐘，濃縮至約 0.5 mL 以下，將濃縮液吸取至 1.5 mL 微量離心管中，供作檢液。



圖二、水檢體過濾裝置

圖三、檢液收集裝置

2.6.2.2. 小量檢體之病毒濃縮：

檢體體積小於 100 mL 時，將檢體分次倒入濃縮離心管過濾槽，於 4°C 以 3000×g 離心 20~30 分鐘，濃縮至約 0.5 mL 以下，吸取濃縮液至 1.5 mL 微量離心管中，供作檢液。

2.6.3. 蔬果類檢體

2.6.3.1. 非軟果類檢體之處理：

小葉菜類、包葉菜類及乾豆苗類檢體，取約 10 g，剪碎為約 2.5 公分大小；根菜類、果菜類檢體，取約 25 g，保持完整性，將檢體分裝至 2 管 50 mL 離心管，加入 BPW 緩衝溶液至 50 mL 刻度；體積較大之檢體則置入無菌袋中，加入 BPW 緩衝溶液 100 mL，於室溫以 80 rpm 均勻振盪 30 分鐘，經附濾網無菌袋濾去殘渣，吸取沖提液至 50 mL 離心管，於 4°C 以 10000×g 離心 30 分鐘，取上清液至另一 50 mL 離心管，加 BPW 緩衝溶液至 45 mL 刻度，再加入 PEG 8000 5 g 及氯化鈉 0.176 g，充分混勻，混合液於 4°C 持續旋轉均勻過夜。

2.6.3.2. 軟果類檢體之處理：

取軟果類(如草莓、藍莓、葡萄)檢體約 25 g，保持完整性，小顆軟果分裝至 2 管 50 mL 離心管，分別加入含果膠酶之 TGBE 緩衝溶液至 50 mL 刻度；大顆軟果則置入無菌袋中，加入含果膠酶之 TGBE 緩衝溶液 100 mL，於室溫以 80 rpm 均勻振盪 30 分鐘，經附濾網無菌袋濾去殘渣，吸取沖提液至 50 mL 離心管，於 4°C 以 10000×g 離心 30 分鐘，取上清液至另一 50 mL 離心管，加 TGBE 緩衝溶液至 45 mL 刻度，調整 pH 值至 7.0，再加入 PEG 8000 5 g 及氯化鈉 0.176 g，充分混勻，混合液於 4°C 持續旋轉均勻過夜。

2.6.3.3. 蔬果類檢液之調製：

取 2.6.3.1. 或 2.6.3.2. 節之混合液，每一檢體各 2 管，於 4°C 以轉速 10000×g 離心 30 分鐘，緩慢倒除上清液，檢體第 1 管加入 PBS 3 mL 反覆沖洗離心管內側及沉澱物，並以旋渦混合器震盪 20 秒，於 4°C 以轉速 10000×g 離心 1 分鐘，將沖洗液吸至檢體第 2 管，重複第 1 管之步驟，得每一檢體 PBS 沖洗液約 5-6 mL，加入等體積之氣仿-丁醇溶液，以旋渦混合器混合均勻後，室溫靜置 5 分鐘，於 4°C 以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，取上清液供作檢液。

2.7. 病毒 RNA 之抽取：

針對貝類檢體，取 2.6.1.3. 節檢液沉澱物，針對飲用水檢體，則取 2.6.2.1. 及 2.6.2.2. 節之病毒濃縮液，依市售套組操作說明步驟抽取病

毒RNA，抽取之病毒RNA收集至已滅菌之1.5 mL離心管，供作病毒RNA溶液。針對蔬果類檢體，取2.6.3.3節之檢液依大體積檢液(1 mL)病毒RNA抽取之市售套組操作說明步驟抽取病毒RNA，並以同一核酸親和性管柱反覆過濾濃縮濾液中之病毒RNA，再以無菌去離子水100~200 μL 回溶病毒RNA，供作病毒RNA溶液。

2.8. 正對照組病毒添加：

貝類檢體取中腸腺 1.5 g，添加正對照病毒株約 10^4 PCR Unit；飲用水檢體則每 mL 水檢體添加 10^2 PCR Unit；蔬果檢體，另取同類檢體作為添加對照組，檢體同時與待測檢體進行裁切與裝袋(管)步驟，在 BPW 或含果膠酶之 TGBE 緩衝溶液震盪洗滌步驟前，先添加之正對照病毒株 10^3 PCR Unit，依 2.6.及 2.7.節，抽取病毒 RNA，供作正對照組。

2.9. 以 DNase I 處理病毒 RNA 溶液：

2.9.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：

病毒 RNA 溶液	24.0 μL
10 倍緩衝溶液.....	3.0 μL
無菌去離子水.....	1.0 μL
DNase I (5 U/ μL)	2.0 μL
總體積.....	30.0 μL

2.9.2. 混合液於 37°C 反應 30 分鐘，續以 75°C 反應 5 分鐘後，立即移置冰浴中，即為經 DNase I 處理之 RNA 溶液，供反轉錄反應用。

2.10. 反轉錄反應：

2.10.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：

病毒 RNA 溶液	5.0 μL
5 倍 TBE 緩衝溶液	5.0 μL
10 mM dNTP	4.0 μL
25 mM 氯化鎂溶液	5.0 μL
隨機引子(3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1.3 μL
0.1 M DTT	2.5 μL
核糖核酸水解酶抑制劑(40 U/ μL)	1.4 μL

反轉錄酶(200 U/ μ L)	0.8 μ L
總體積.....	25.0 μ L

2.10.2. 混合液配製完成後，依下表條件進行反轉錄反應^{註3}：

步驟	溫度($^{\circ}$ C)	時間(min)
	25	10
反轉錄	50	50
	85	15

反應完畢立即移置冰浴中，此為 cDNA 產物，供聚合酶鏈反應用。

註3：對於同一管 RNA，應至少進行二重複反轉錄反應。

2.11. 第一次聚合酶鏈反應(PCR)：

2.11.1. 取微量離心管，依下表配製第一次 PCR 混合液：

cDNA 產物	5.0 μ L
10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂).....	5.0 μ L
2.5 mM dNTP	4.0 μ L
10 μ M 引子 F ^(註4)	1.0 μ L
10 μ M 引子 R ^(註4)	1.0 μ L
DNA 聚合酶(5 U/ μ L).....	0.5 μ L
無菌去離子水.....	33.5 μ L
總體積.....	50.0 μ L

註4：檢測 A 型肝炎病毒，採引子對 HAV68/HAV240 及 VP1-4/VP1-5。

2.11.2. 混合液配製後，依下表條件進行 PCR：

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95 $^{\circ}$ C	4 min
2. 變性	95 $^{\circ}$ C	30 sec

3.黏接	50°C	30 sec
4.延展	72°C	1 min
步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應。		
5.最終延展	72°C	7 min

2.11.3. 膠片電泳分析：

取適量之 6 倍載入膠片緩衝溶液，分別與 DNA 分子量標記物質、無菌去離子水(空白組)及 PCR 增幅產物混合均勻，注入 2.5%膠片孔中，以 50 或 100 伏特電壓進行電泳。電泳後之膠片置入膠片染液中染色約 10 分鐘後，續置入水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。當檢體中含有 A 型肝炎病毒時，引子 HAV68/HAV240 在 173 bp 位置、引子 VP1-4/VP1-5 在 369 bp 位置上應各有一明顯 DNA 螢光帶。當第一次聚合酶鏈反應結果無明顯 DNA 螢光帶時，應續進行第二次 PCR，每次反應皆應有正對照組及空白組，正對照組添加 A 型肝炎病毒，空白組為無菌去離子水。

2.12. 第二次 PCR：

2.12.1. 取微量離心管，依下表配製第二次 PCR 混合液：

第一次 PCR 產物之稀釋溶液 ^(註 5)	5.0 µL
10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂)	5.0 µL
2.5 mM dNTP	4.0 µL
10 µM 引子 F ^(註 6)	1.0 µL
10 µM 引子 R ^(註 6)	1.0 µL
DNA 聚合酶(5 U/µL)	0.5 µL
無菌去離子水	33.5 µL
總體積	50.0 µL

註 5：第一次 PCR 產物建議以 10 至 20 倍無菌去離子水進行稀釋，供作第二次 PCR 反應 DNA 模板。

註 6：檢測 A 型肝炎病毒，採引子對 HAV68 / HAV240 及 VP1-4 / VP1-5。

2.12.2. 混合液配製後依下表條件進行 PCR：

步驟	溫度	時間
1.最初變性	95°C	4 min
2.變性	95°C	30 sec
3.黏接	60°C	30 sec
4.延展	72°C	1 min
步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應。		
5.最終延展	72°C	7 min

2.12.3. 膠片電泳分析及結果判讀：

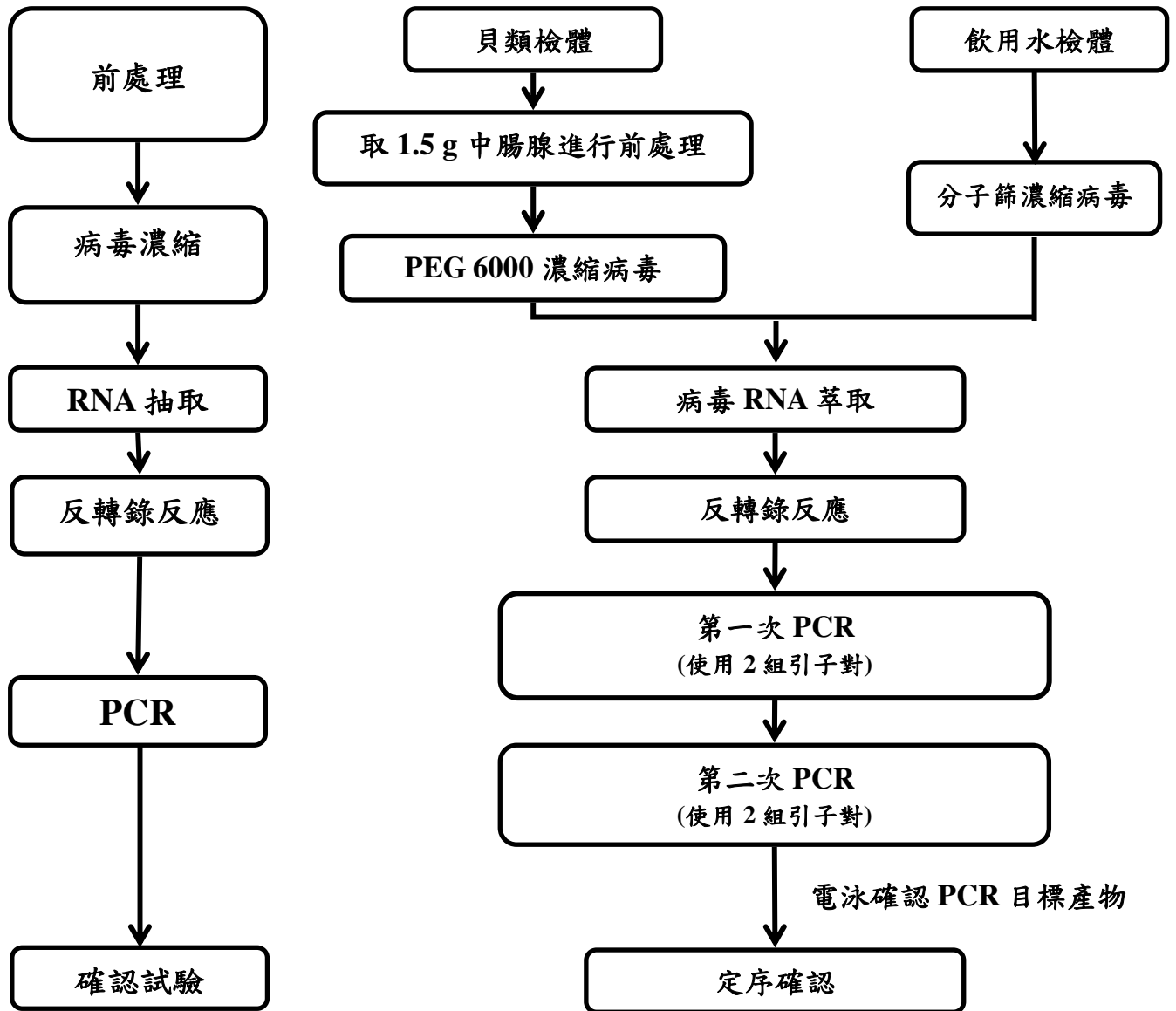
依2.11.3.節步驟進行膠片電泳分析及結果判讀。當檢體中含有A型肝炎病毒時，引子HAV68/HAV240在173 bp位置、引子VP1-4/VP1-5在369 bp位置上應各有一明顯DNA螢光帶。每次反應皆應有正對照組及空白組，正對照組添加A型肝炎病毒，空白組為無菌去離子水。

2.12.4. 定序及序列比對：

依 2.12.3.節，於膠片電泳確認 PCR 產物後定序。取得定序結果，將序列上載至美國國家衛生院 NCBI Blast 網頁，與 GenBank 資料庫做序列比對，以確認 A 型肝炎病毒。同一管 RNA 之二重複檢驗，若任一次之結果為陽性時，視為檢驗結果陽性；二重複之結果皆為陰性時，視為檢驗結果陰性。

附註： 本方法反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

檢驗流程圖(貝類及水)



檢驗流程圖（蔬果）

