



Helicobacter ve Campylobacter

Prof. Dr. İştar Dolapçı
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ AD
25 Kasım 2016

Öğrenim Amaç ve Hedefleri:

- *Campylobacter* ve *Helicobacter* türlerinin mikrobiyolojik özelliklerini tanımlama
- İnsanlarda oluşturdukları hastalıkların patogenezi kavrama ve klinik görünüşleri hakkında fikir sahibi olma
- Oluşturdukları hastalıklarda hangi sistemlerin tutulduğunu, hangi klinik örneklerin alınacağını ve nasıl işleneceğini bilme
- Bu mikroorganizmaların mikrobiyolojik özelliklerine dayanarak laboratuvar tanıları koyabilme
- Tedaviyi yönlendirecek bilgiye sahip olma
- Epidemiyoloji hakkında yorum yapabilme

Ders İçeriği:

- *Campylobacter* ve *Helicobacter* cinslerinin sınıflandırılması
- *Campylobacter*'lerin morfolojik özellikleri
- *Campylobacter* türlerinin ilişkili oldukları klinik durumlar
- *Campylobacter* enfeksiyonlarında patogenezi
- *Campylobacter* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi
- *Campylobacter* enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı
- *Campylobacter* enfeksiyonlarında korunma ve tedavi
- *Helicobacter pylori*'nin yapısal özellikleri
- *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının patogenezi
- *Helicobacter pylori* epidemiyolojisi
- *Helicobacter pylori*'ye bağlı klinik durumlar
- *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı
- *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarında korunma ve tedavi

Sınıflandırma

Sınıflandırılmaları ilk keşfedildikleri tarih olan 20. yüzyılın başından bu yana defalarca değişmiştir. Moleküler yöntemlerin uygulanmaya başlamasıyla birlikte;

- ✓ 16S rRNA genlerinin analizi,
- ✓ Hücre duvar proteinlerinin yapısı,
- ✓ Biyokimyasal özellikleri birlikte değerlendirilerek yeni bir taksonomi oluşturulmuştur.

***Helicobacter* ve *Campylobacter*;**

- ✓ Aynı rRNA süperaillesine aittirler.
- ✓ Spiral, Gram negatif çomaklardır.
- ✓ G+C/DNA oranları düşüktür.

- ✓ Karbonhidratları oksidize ya da fermente etmezler.
- ✓ Mikroaerofilik ortamda ürerler.

Campylobacter spp.

Küçük (0.2-0.5 x 0.5-5 mm), kama, S veya martı kanadı şeklinde, oksidaz pozitif, gram negatif basillerdir. Virgül şeklinde olanlarda tek uçta bir adet; S şeklindekilerde iki uçta birer adet bulunan kirpiği ile **ÇOK HAREKETLİ** dir. Çok hızlı, tribüşon gibi hareket eder. Sporsuzdurlar. Gastroenterit ve septisemiye yol açarlar.

Campylobacter jejuni; jejenum bölgesini tutar. Gastroenteritlerin çoğundan sorumlu olan türdür. AIDS'li olgularda bakteriyemi yapabilir.

Campylobacter coli; kolonda yerleşir. Gastroenteritlerin ~%2-5'inden sorumlu tutulur. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde gastroenterit etkeni olarak izlenir.

Campylobacter upsaliensis; izolasyon besiyerlerinde kullanılan antibiyotikler tarafından inhibe edildiği için gastroenteritlerin tam olarak ne kadarından sorumlu olduğu bilinmemektedir (tahminen ~%10)

Campylobacter fetus; ilk olarak fotal enfeksiyonlarda izlendiği için bu adı almıştır.

Campylobacter'lere bağlı sistemik enfeksiyonlar (bakteriyemi, menenjit, endokardit, septik artrit, septik tromboflebit, septik abortus gibi) çoğunlukla *C.fetus* ile izlenir.

Campylobacter lari; sağlıklı martılarda bulunduğu gösterilmiştir. Çocuklarda tekrarlayan hafif ishal olgularında bulunduğu bildirilmiştir.

Gastroenterit etkeni olarak tanımlanmaları zaman almıştır, çünkü **mikroaerofiliktirler** (oksijeni azaltılmış ortam ister); %5-7 O₂, %5-10 CO₂ içeren ortamda ürerler (anaerobik kavanoz). **Küçüktürler** (0.2-0.5 µm). ***Campylobacter jejuni* 42°C'de** daha iyi ürer. Diğer enterik bakteriler 42°C'de üreyemediklerinden izolasyonu kolaylaşır.

Antijenik yapı:

Tipik Gram negatif hücre duvar yapısına sahiptirler (Dış membran, **LPS**, LOS). Major antijenleri dış membrandaki lipopolisakkarittir (**endotoksin**).

Patogenez:

Hastalığın ortaya çıkışı **enfeksiyöz dozla** doğrudan ilişkilidir. Mikroorganizma gastrik asit tarafından öldürülür. Gastrik asidi azaltan ya da etkisini nötralize eden koşullar hastalığın oluşmasına yardımcı olur (Alınan mikroorganizma miktarının fazla olması ya da hangi gıdalarla beraber alındığı gibi). Hastanın bağışıklık durumu da hastalığın derecesi üzerine etkilidir, örneğin hipogamaglobülinemi'li hastalarda *C.jejuni* enfeksiyonları ağır seyreder.

Mukozal yüzeylerde; (jejenum, ileum & kolon) ülserasyon, enflamasyon, kanama vardır. Dışkıının makroskopik incelenmesinde kanlı alanlar göze çarpar, dışkıda kan hücreleri görülür. Bu bulgular bakterinin **invazyonuyla** uyumludur. Ayrıca; **sitotoksin** ürettiği de gösterilmiştir (CDT: Cytolethal distending toxin)

Komplikasyonlar:

C.jejuni ve ***C.upsaliensis***'in **Guillain-Barre sendromu** ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Periferik sinir sisteminin otoimmün bir hastalığıdır; kaslarda simetrik zayıflık gelişimi ile karakterizedir; iyileşmesi

haftalar, aylar sürer. Özellikle *C.jejuni* serotip O:19 ile bağlantılı bulunmuştur. Yaygın değildir (yaklaşık 1/1000 olgu). Bakteri yüzey LPS ile periferik sinir doku arasındaki çapraz antijenik reaksiyona bağlı olduğu düşünülmektedir.

Campylobacter enfeksiyonlarının bir diğer geç komplikasyonu **reaktif artrit**dir. Otoimmün mekanizmalara bağlıdır. El, bilekler, dizlerde, bir haftadan birkaç aya kadar süren ağrılı eklem şişmeleri söz konusudur. Diyarenin şiddeti ile reaktif artrit gelişimi arasında bir ilişki yoktur. Ancak HLA B17 doku tipi taşıyan kişilerde daha sık izlenmektedir.

C.jejuni, *C.coli* ve *C.upsaliensis* nadiren bakteriyemi nedeni olur (1.5/1000 diyareli olgu). *C.fetus* özellikle immünsuprese bireylerde (AIDS, karaciğer hastalığı, DM, kronik alkolizm, maligniteli hastalar gibi) GIS'den kana geçerek bakteriyemi yapma eğilimindedir.

İnvitro çalışmalarda diğer *Campylobacter*ler kolayca öldürülürken ***C.fetus*** 'un serumda kompleman ve antikor bağımlı öldürme mekanizmalarından kaçtığı gösterilmiştir.

C.fetus'un yüzeyi diğerlerinden farklıdır; mikrokapsül veya S tabakası olarak tanımlanan ısıya dayanıklı, kapsül benzeri bir protein yapısında antijen ile kaplıdır. Bu tabaka bakteri yüzeyine C3b'nin bağlanmasını önler, takip eden kompleman aracılı öldürme gerçekleşmez. S tabakası çıkarılınca bakterinin virülansını kaybettiği gösterilmiştir.

Epidemiyoloji:

ZOONOZdur. Taşıyıcı hayvanlar çeşitlidir (koyun, sığır, keçi, domuz, köpek). Besi hayvanlarında normal flora elemanı gibi davranır. *C.upsaliensis* için temel sorumlu evcil köpeklerdir. Hastalık sıcak aylarda daha yaygın olmakla birlikte tüm yıl boyunca görülebilir. Gıda & içeceklerle **oral** yoldan ya da enfekte hayvan / ürünleriyle **temas** ile alınır (pastörize olmamış süt, iyi pişmemiş et, yumurta ile). Kontamine gıdalarda renk, koku, tat değişikliği yoktur. İnsandan insana fekal-oral bulaş görülebilse de; gıda sektöründe çalışanların ellerinden bulaş yaygın değildir. Süt gibi mide asidini nötralize eden gıdalar ile alınmaları, gerekli enfeksiyöz dozu belirgin oranda azaltır. Enfeksiyon oluşturmak için en az 10^4 bakteri gereklidir.

Klinik:

C.jejuni, *C.coli* ve *C.upsaliensis* akut enterit tablosuna yol açarlar. Diyare, ateş, kramp tarzı ciddi abdominal ağrı izlenir. İnkubasyon 1-7 gün sürer. Dışkı kanlı olabilir. Klinik tablo genellikle kendini sınırlar. Semptomlar bir hafta ya da daha uzun sürebilir. Karın ağrısı akut apandisit taklit edebilir. Bağışıklığı baskılanmış olanlarda bakteriyemi görülebilir (özellikle *C.fetus* a bağlı).

Laboratuvar tanı:

Laboratuvar tanı amacıyla kullanılabilecek klinik materyal dışkı örneğidir.

MİKROSKOPİ

Dışkının Gram boyasında tipik "**martı kanadı**" görünümü izlenebilir. Çok ince olduklarından kolay görünmezler. Dışkı alındıktan sonraki ilk 2 saat içinde yapılacak olan karanlık alan ya da faz kontrast mikroskopi incelemelerinde mikroorganizmanın tipik "**sıçrayıcı**" hareketi (**şişe mantarı**) izlenebilir.

KÜLTÜR

Besiyeri ve üreme koşulları diğer ishal etkenlerinden farklılık gösterir! Seçici besiyerine ekilmelidir. Uygun inkubasyon şarttır. Mikroaerofilik ortam gerekir. İki adet besiyerine ekim önerilir; biri 37°C; diğeri 42°C'ye kaldırılır. Besiyeri toksik oksijen radikallerini uzaklaştırabilmek için kan ya da kömür

içermelidir. Diğer mikroorganizmaların üremesini baskılamak için antibiyotik kullanılmalıdır (vankomisin, polimiksin B, trimetoprim, novobiyosin, basitrasin, kolistin, sikloheksimid, sefalosporin gibi).

C.jejuni / *C.coli* ; Modifiye Skirrow by, Campy BAP by, kan içermeyen kömür temelli by; 42°C; 72 saat
C.fetus /*C.upsaliensis* ; Modifiye Skirrow by, kan içermeyen kömür temelli by; 37°C; 72 saat – 7 gün

Skirrow besiyeri; Vankomisin, Polimiksin B, Trimetoprim içerir.

Kullanılan antibiyotiklerin çoğu *C.upsaliensis*'i baskılar ☹ . *C.fetus* üretilmek isteniliyorsa besiyeri sefalosporin içermemeli ve 37°C'de inkübe edilmelidir. Campylobacterler yavaş üreyen mikroorganizmalardır. En az 48–72 saat inkubasyona ihtiyaç duyarlar. Kolonileri gri, beyaz, yassı, mukoid görünümlüdür

İzolasyon;

Mikroorganizmanın küçük boyutu dışkı örneğinden filtrasyonla izolasyon şansını artırır. Diğer bakteriler geçemezken Campylobacterler 0.45 µm çaplı filtrelerden geçebilirler (0.65–0.45 µm çaplı filtreler dışkı florasını tutar). Dışkı böyle filtrelerden süzöldükten sonra çukolata agar gibi seçici olmayan bir besiyerine bile ekim yapılırsa izolasyon şansı artar, ancak; pratik değildir. İzolasyon; klinik ön tanı, özel koşullar altında üremesi, tipik mikroskopik morfolojisi, pozitif oksidaz ve katalaz testlerine dayanır. Karbonhidratları oksidize ya da fermente etmezler. İleri mikrobiyolojik identifikasyon testlerine başvurulabilir.

Tedavi:

Sıvı-elektrolit replasmanı yapılmalıdır. Eğer; yüksek ateş, kanlı ishal, günde 10'dan fazla dışkılama, bir haftadan uzun süreli klinik tablo varsa; antibiyotik tedavi verilmelidir. Enterit tablosunda ilk seçenek **eritromisin**dir. Standardize yöntem olmadığı için rutin antimikrobiyal duyarlılık testi uygulanmaz. Diğer seçenekler; tetrasiklin ve florokinolonlardır. Ancak florokinolonlara direnç gittikçe artmaktadır. İzolatların çoğu penisilin, sefalosporin ve sulfonamidlere dirençlidir. Sistemik enfeksiyonlarda; aminoglikozid, kloramfenikol, imipenem verilir.

Korunma:

Aşısı yoktur. Gıdaların hazırlanmasında sanitasyon kurallarına dikkat edilmelidir. Hayvan kaynaklı gıdaların iyi pişirilmesi gerekir. Pastörize edilmemiş ürün tüketiminden kaçınılmalıdır. Suların dezenfeksiyonu için kullanılan miktardaki klordan etkilenirler; uygun klorlamaya dikkat edilmelidir.

Helicobacter pylori

Doğal ortamı insan gastrik mukozasıdır. Bulaş yolu tam olarak bilinmemektedir. Feçes & dış plaklarından izole edilebilir; gıda ve su yoluyla oral olarak bulaştığına inanılmaktadır. Mide mukus tabakası içinde yaşar, epiteli invaze etmez.

Sarmal görümlü, gram negatif basildir. Dokuda spiral; kültürlerde basil veya kıvrık kokumsu görümlüdür.

Gastrit, duodenal ülser, gastrik ülser, gastrik adenokarsinoma, gastrik MALT B hücreli lenfoma oluşumları ile ilişkilidir.

Yapısal özellikler:

Bir ucundaki çok sayıda (4-6 adet kılıflı) kirpik ile aktif hareketlidir; hareketi tribüsona benzer. Kuvvetli **üreez** üretir, bu özelliğinden hızlı tanıda yararlanır. Mide asiditesinde yaşamını devam ettirebilmesinde (asiditeden kaçmasında) bu iki özelliği önemlidir.

Katalaz & oksidaz pozitifdir. Karbonhidrat oksidasyonu ya da fermentasyonu yapmaz. Aminoasitleri fermentatif olarak metabolize eder. Kan, serum, kömür tozu, nişasta, yumurta sarısı ilave edilmiş zengin besiyerinde, mikroaerofilik ortamda, en iyi %98 nemli & %5-10 CO₂'li ortamda, 30-37°C'de, 3-6 günde ürer. Üremesi zor olduğundan tanı doğrulamasında kültür dışı teknikler kullanılır.

Patoloji / Patogenez:

Oral yolla bulaşır. Tedavi edilmeyen kişilerde midede hayat boyu kolonize olarak kalabilir. Mide asiditesinde (**lümende**) yaşayamaz, en iyi pH 7.0 – 8.0'da ürer. Midede mukus tabakasının derinlerinde; epitelyal yüzeye yakın bulunur. Gastrik mukus, asit geçişine izin vermeyerek tampon görevi yapar (Mukus tabakasının;lümen tarafında pH 1.0 – 2.0, epitelyal tarafta pH 7.4'dür).

Başlangıçta Kolonizasyon; Asit inhibitör protein ile mide parietal hücrelerinin asit sekresyonunu engeller. Üreez aktivitesi ile; amonyak oluşturarak mide asidini parçalar. Üreez enzimiyle açığa çıkan amonyak bakteriyi sararak gastrik asidin lokal nötralizasyonunu sağlar.

Sonrasında, Midenin Alt Tabakalarına İniş; Hareketli olması; epitelyal yüzeye ulaşmasını sağlar. Adezyon özelliği; mide epiteline hücre duvar LPS'leri ve pilileri ile tutunur.

Sonrasında, Lokalize Doku Hasarı; Üreez aktivitesi sonucu oluşan amonyak mide epitel hücreleri için toksiktir, hücreler arası tutunmayı azaltır ve etkenin salgıladığı sitotoksinlerin etkisini artırır. Müsinaz enzimi ve fosfolipazlar; gastrik mukusu parçalar. Vakuol oluşturucu sitotoksin A (VacA); epitel hücrelerinde vakuol oluşturur. Sitotoksin-ilişkili gen (*cagA*); bir diğer önemli virülans faktörüdür; Tip IV sekresyon sistemini kodlar. Bu sistem CagA proteinini hücre içine enjekte eder, bu protein normal epitel hücrelerinin iskelet yapısına girerek bozar.

- Duodenal ülserlerin ~%95'inden;
- Gastrik ülserlerin ise ~%85'inden *H.pylori* sorumludur

Epidemiyoloji:

H.pylori için doğal rezervuar insanlardır. Fekal-oral / Oral-oral bulaşır. Diş plaklarının *H.pylori* için rezervuar olduğuna dikkat çekilmektedir. İyice temizlenmemiş endoskoplara ile de insandan insana geçiş olmaktadır. Aile içi enfeksiyonlar görülebildiği için *H.pylori*'nin insandan insana bulaşı muhtemel görünmektedir. Aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Klinik:

Gastritin akut fazında, doyumluk hissi, bulantı & kusma ile seyreden üst GIS enfeksiyonu yapar. Akut enfeksiyon 1-2 hafta sürer. Ancak genetik olarak duyarlı kişilerde zamanla kronik gastrit gelişir. Kronik gastrit sonunda, normal gastrik mukoza intestinal tip epitel proliferasyonu ve fibrozis ile iyileşir. Bu durum hastanın gastrik kanser riskini, *H.pylori* suşuna ve konak immün yanıtına bağlı olarak yaklaşık 100 kat artırır. *cagA* pozitif suşlar ve yüksek düzey IL-1 üretimi, yüksek kanser gelişim riski ile ilişkili bulunmuştur.

Laboratuvar Tanı:**İNVAZİV YÖNTEMLER**

Örnek, endoskopi ile alınan biyopsi materyalidir. Bu materyalden boya, kültür, üreaz testi ve moleküler yöntemler çalışılır.

NON-İNVAZİV YÖNTEMLER

Üre solunum testi, serolojik testler ve dışkı ve mide sıvısında da *H.pylori* DNA'sı aranması temeline dayanan moleküler yöntemler (PCR) bu grupta yer alır.

Mikroskopi:

Gastrik biyopsi örneği histolojik olarak incelenir. **Hematoksilen-eozin** ya da **Gram** boyama ile mikroorganizma görülebilse de en duyarlısı; **Warthin-Starry gümüşleme** yöntemidir. Yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü %100'e yakındır. Tanıda "altın standart" olarak kabul edilebilir ancak; İNVAZİV bir yöntemdir! Dışkının mikroskopik incelemesi geçerli bir yöntem değildir!

Antijen Saptanması (Üreaz Testi / Biyopsi materyalinde):

Biyopsi materyali, üre ve renk indikatörü içeren bir besiyerine konur. Christensen besiyeri ve Stuart üre testi solüsyonu (%10 üre + %1 fenol kırmızısı solüsyonu) bu amaçla uygun besiyerleridir. Materyal *H.pylori* içeriyorsa; bakterinin üreaz enzimi besiyerindeki üreyi hızla (1 saat içinde) parçalar, pH değişikliği nedeniyle indikatör renk değiştirir. (*Y.enterocolitica* ve *P.vulgaris* de üreaz yapar ancak testi 12 saatte pozitifleştirirler) Testin duyarlılığı %75-95 arasındadır ancak özgüllüğü %100 olarak kabul edilmektedir. Pozitif sonuç aktif enfeksiyon lehinedir. Dezavantajı, biyopsi materyali gerektirmesidir! Mikroskopi gibi ☹

Üre Solunum Testi (Non-invaziv):

Benzer bir test **in vivo** olarak yapılır: Hastaya oral yoldan radyoaktif işaretli (¹³C / ¹⁴C) üre verilir. Hastada *H.pylori* varsa üreaz aktivitesine bağlı olarak 1 saat içinde hastanın çıkardığı havada işaretli CO₂ saptanır. (Üre → Amonyak + su + CO₂) Duyarlılık ve özgüllüğü %90-100 arasındadır. Dezavantajı; pahalı olmasıdır; ekipman gerektirir.

Antijen saptanması (Dışkıda):

Dışkıda ELISA yöntemiyle *H.pylori* antijenleri aranır. Özgüllük ve duyarlılık %95 kabul edilir. Yöntemin uygulaması kolay ve ucuzdur. DİŞKIDAN KÜLTÜR BAŞARISIZ! Dışkıda antijen saptanması hem enfeksiyon tanısı hem de tedavi başarısının takibi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Nükleik asit temelli testler:

Araştırma laboratuvarlarıyla sınırlıdır. Klinik tanı amacıyla kullanılmamaktadırlar.

Kültür:

En güvenilir tanı yöntemidir. Antibiyograma da izin verir, ancak; bakteri zor ürer, çevre şartlarından çabuk etkilenir, izolasyon ve identifikasyonu zaman alır. Sonuç olarak kültürde üreme yoksa, *H.pylori* yoktur demek doğru değildir!

Mikroaerofilik atmosfer koşullarında, zengin besiyerinde (bakteriyi serbest oksijen radikalleri, hidrojen peroksit ve yağ asitlerinden korumak için; kan, hemin, kömür içeren besiyerlerinde)

üretilebilir. Örnek gastrik mukozal biyopsi örneğidir, invaziv örneklerdir. Dışkıda canlı olarak ya da kanda bulunmaz.

Biyopsi örneği; çukulata agar ya da %5 koyun kanlı Brucella agar gibi seçici olmayan bir besiyerine ya da Skirrow besiyeri ya da Modifiye Thayer Martin besiyeri gibi seçici bir besiyerine ekilebilir. 1-2 mm çapında ışığı geçiren koloniler oluşturur.

İdentifikasyon; üreme özellikleri, tipik mikroskopik görünüm ve oksidaz, katalaz & üreaz aktivitelerinin varlığı ile yapılır.

Seroloji:

IgM erken dönemde belirir, sonra kaybolur. IgG ve IgA, IgM'in hemen arkasından belirir ve aylar / yıllarca kalırlar; ancak koruyucu değeri yoktur.

Bağışıklık:

Antikor saptanması tek başına yeni enfeksiyon tanısı koyduramaz. Tanıyı doğrulama amacıyla kullanılabilir. Antikor titresinin hastalığın şiddeti ya da tedaviye yanıtla ilişkisi yoktur. Seroloji epidemiyolojik çalışmalar için yararlı bir veridir.

Tedavi / Korunma:

14 gün (2 hafta) süre ile kombine tedavi uygulanır:

1. Bir β-laktam antibiyotik (örn.Amoksisilin)
2. Bir makrolid antibiyotik (örn.Klaritromisin)
 - Amaç: *H.pylori* eradikasyonu
3. Proton pompa inhibitörleri (lansoprazol, omeprazol gibi)
 - Asit salgısını inhibe eder, pH'yı arttırlar
 - Amaç: Ülser tedavisi

H.pylori kalmadı diyebilmek için; 4 hafta sonra alınan doku örnekleri incelenmelidir.

Eradikasyon sağlanamazsa dörtlü tedavi:

1. Lansoprazol,
2. Bizmut sitrat,
 - Ülser tabanındaki proteinli eksuda ile birleşerek koruyucu bir tabaka oluşturur
3. Tetrasiklin ve
4. Metronidazol

KAYNAKLAR:

1. Sherris Medical Microbiology; Ryan KJ, Ray CG (Eds), McGraw Hill Education, 6th ed, 2014.
2. Mims' Medical Microbiology; Goering RW, Dockrell HM, Zuckerman M, Roitt IM, ChiodiniPL (Eds), Elsevier Saunders, 5th ed, 2013.
3. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology; Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA (Eds), McGraw Hill Lange, 25th ed, 2010.
4. Medical Microbiology; Murray, Rosenthal, Pfaller (Eds), Elsevier Saunders, 7th ed, 2013.
5. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology; Tille PM (Ed), Elsevier Saunders, 13th ed, 2014.