

تشخیص سریع ویبریون و با با میکروسکپ کنتراست دوفاز

دکتر پرویز ادیب‌فر* دکتر حسین سعادت‌زاده*

مقدمه

قطعی عامل بیماری و سپس آزمایش‌های سرمی و شیمیایی مختلف برای تعیین تیپ ویبریون‌های جدا شده انجام میگردید.

اصولاً برای اجرای کار بدین قرار است که از مدفوع بیماران قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک یا هر داروی دیگر بمحض ورود نمونه برداری شده و در آب پیتونه کشت داده میشود و سپس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۶ تا ۸ ساعت میماند و از آب پیتونه روی محیط TCBS و مونسور (Monsour) برده میشود و ۱۸ ساعت در اتوو نگهداری میگردد. کلنی‌های ویبریون و با روی محیط TCBS زرد بلغمی و روی محیط مونسور خاکستری تیره بدست میآید که کاملاً با کلنی‌های آنتر و کولک و پروتئوس‌ها و سایر آنتر و باکتری‌ها فرق دارد. سپس از کلنی‌های مشکوک به باوروی محیط گلیکولر برده و پس از مدتی از آن برداشت نموده آزمایش آگلوتیناسیون کلاسیک ابتدا با آنتی‌سرم پلی‌والان و سپس با سرم‌های اختصاصی او گاوا و اینا با انجام میشود. تمام ۱۷۴ سوش که تحت بررسی قرار گرفت با آنتی‌سرم پلی‌والان و سرم ضد اینا با مثبت ولی با سرم ضد او گاوا منفی بوده‌اند. ضمناً ویبریون‌های فوق محیط نیمه جامد مانیتول را تخمیر مینمودند. اکسید از مثبت و آندول مثبت و تخمیر قندهای مانوز و ساکاروز مثبت و آرا بینوز منفی بوده‌اند گلبول قرمز تازه و دو درصد مرغ را آگلوتینه میکردند و تعدادی از آنها همولیز روی ژل خون دار که با گلبول قرمز گوسفند تهیه شده بود میدادند و برخی نیز V.P. مثبت بودند که در نتیجه تشخیص ویبریون التور تیپ اینا با داده شده همزمان با این آزمایشها برای مقایسه و بررسی سریع آگلوتیناسیون و ایموبیلیزاسیون از روش بامیکروسکپ کنتراست دوفاز استفاده شد که بطور خلاصه در اینجا شرح داده میشود:

وبا در بعضی مناطق مثل هند - پاکستان - هندوچین و برمه بصورت پراکنده وجود دارد و هر گاه مواد آلوده یا بیمارانی از این کشورها به نقاط دیگر جهان وارد شوند همه گیری صورت میپذیرد [۸] در این موقع تشخیص سریع اهمیت فراوان برای طرح مبارزه ضدوبائی دارد و بهمین جهت تا بحال روشهای مختلفی بر پایه خصوصیات شکلی - رنگ آمیزی - کشت و خواص بیوشیمیایی و لیز اختصاصی در برابر فاژها بکار برده شده است که کم و بیش ارزنده‌اند (Koch 1884, Ermolieva 1942, Kopookova 1959) ولی آگلوتیناسیون با سرم‌های اختصاصی ضد وبا که از سال ۱۹۰۲ بوسیله کول و گوت شلیش (Koll et Gottschlich) [۵۰۲] معمول شده است از همه آسانتر و نتیجه بخش‌تر بوده است بویژه که بکمک میکروسکپ کنتراست دوفاز که بنسون [۳] و همکارانش در سال ۱۹۶۴ برای تشخیص وبا بکار برده‌اند و ارمولیا و گیون تال [۴] محققین انستیتو مرکزی پزشکی مسکو در سال ۱۹۶۶ مزیت آنرا بر میکروسکپ زمینه سیاه نشان داده‌اند، آسان تر است. زیرا آنها آگلوتیناسیون بلکه بی حرکت شدن (ایمو-بیلیزاسیون) ویبریونها را هم میتوان دید و امکانات فوق العاده زیادی برای تشخیص سریع ویبریون و با بوجود آورد.

از این روش برای مقایسه سرعت و تشخیص قطعی وبا ما نیز استفاده کرده و نمونه‌هایی از سوشهای بخش میکروبشناسی دانشکده پزشکی را مورد بررسی قرار داده و نتایج درخشان بدست آورده‌ایم.

مواد و روش آزمایش

از بیماران مشکوک به وبا کشت مدفوع بمنظور تشخیص

* دانشجویان گروه میکروبشناسی و ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران

کنتراست دوفاز نه تنها آگلوتیناها بلکه بی حرکت شدن میکروبهای ریز هم که در اثر سرم‌های اختصاصی خود آنها ایجاد میشود به وضوح قابل رؤیت و بررسی است و میتوان با محاسبه زمان لازم برای بی حرکت شدن و بیرون‌هاشده و عیار آنتی‌سرم‌ها و یا قدرت آگلوتینه شدن و بیرون‌ها را تعیین نمود [۴] بخصوص که میکرو-سکپ کنتراست دوفاز برعکس زمینه سیاه احتیاجی بروغن گذاری در کندانس‌اتور و یا تعویض و تنظیم مکرر عدسی‌های ابژکتیف (ابتدا کوچک و سپس بزرگ) ندارد و باعث اتلاف وقت و طولانی شدن کار نمیشود به همین علل کنتراست دوفاز جان‌نشین میکروسکپ عادی و زمینه سیاه در این روش شده است.

ساختمان آنتی ژنی و بیرون‌ها [۸۹۲] - و بیرون و با چه نوع کلریک (Choleric) و چه نوع التور (Eltor) دارای دو دسته آنتی ژن‌های مشابه اند که یکی اختصاصی گرمی پایدار و سوماتیک (O) و دیگری مشترک گرمی ناپایدار و فلاژلر (H) است، آنتی ژن (O) خود شامل سه گروه آنتی ژنی است که از همه مهمتر آنتی ژنهای پولیوزیدیک است که اختصاصی بوده و در غشاء و بیرون زنده وجود دارد و انواع مختلف دارد که سه تای آنها یکی اصلی (A) و دو تای دیگر اشتراکی و فرعی (C و B) مورد قبول همه است و رویهمرفته سه تیپ و بیرون کلر آ والتور متمایز از هم بنام اینا با Inaba (AC) و اوگاوا Ogawa (AB) و هیکوجیما Hikojima (ABC) بدست میدهد.

سایر آنتی ژنهای پولیوزیدیک و نیز دو گروه دیگر آنتی-ژنهای پروتیدی (O) که یکی هماگلوتینوژن و دیگری پروتیدی سیتوپلاسمی میکروب است و همچنین آنتی ژنهای پروتیدی گرمی ناپایدار (H) تاژکها غیر اختصاصی اند به همین جهت در حال حاضر قاعده بر این است که برای تشخیص و با سوسپانسیون از کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته و بیرون روی ژلوز در آب نمک ۸٫۵ در هزار تهیه مینمایند که باید حداقل به میزان نصف عیار نهائی سرمهای پولی-والان Anti O که بروش سازمان بهداشت جهانی O.M.S. بر ضد اینا با و اوگاوا تهیه شده است آگلوتیناسیون بدهد و برای تشخیص تیپ و بیرون آگلوتیناسیون آنسرا با سرم منوالان ساتوره B برای اوگاوا و سرم منوالان ساتوره C برای اینا با در نظر میگیرند که اگر به میزان یک صدم و بالاتر آگلوتیناسیون بدهد اختصاصی و قابل قبول است.

روش اجرای آزمایش

۱- از کشت ۱۰ تا ۱۲ ساعته و بیرون روی ژلوز تعلیقی استاندارد در آب پپتون دار یک در صد تهیه میکنیم که هر سانتی متر مکعب آن دارای یک تایک و نهم میلیار میکروب

مکانیسم آزمایش- و بیرون و با در آب پپتون دار سرعت رشد کرده و پس از ۴ تا ۶ ساعت آنرا کدر نموده و پرده خیلی نازکی در سطح آن ایجاد میکنند که میتوان در فواصل مختلف زمان از آن برداشت نموده روی ژلوز کشت داد و در زیر میکروسکپ کنتراست دوفاز از تعلیق این کشت تازه و بیرون و یا مستقیماً از مواد طبیعی بیماران (مدفوع- استفراغ- محتویات روده) را قرار داد و بخوبی شکل و حرکت و بیرون‌ها را مشاهده کرد و حتی با افزودن سرمهای آگلوتینان اختصاصی و رقیق شده آنها را بی حرکت و آگلوتینه نمود و نوع و بیرون و عیار ایموبیلیزان و آگلوتینان سرم را معین و مشخص کرد که بر مراتب این روش آسانتر و دقیقتر از کار با میکروسکپ زمینه سیاه است. و خیلی زود حتی چند دقیقه پس از رسیدن مواد و ترشحات بیماران به آزمایشگاه میتوان انجام داد و نتیجه را اعلام نمود.

خصوصیات و موارد استفاده میکروسکپها [۶]- اشعه نورانی (طول موج بین مادون قرمز و ماوراء بنفش) را میتوان در میکروسکپ کلاسیک زمینه سیاه و کنتراست دوفاز بکاربرد جسمی که روی صفحه میکروسکپ در مسیر این اشعه قرار میگیرند این اشعه را جذب کرده منعکس یا منکسر مینماید که مجموع اشعه بازتاب ساختمان حقیقی جسم را نشان میدهد. در میکروسکپ معمولی برای بهتر دیدن اجسام نمیتوان تصویر آنها را بیش از حد درشت نمود زیرا سبب بهم خوردن وضوح و دیدن نقاط ظریف جسم میشود و به همین جهت از رنگ آمیزی استفاده میکنند تا با کنتراست مختلف رنگها تصویر واضح تر دیده شود. با بکاربرد میکروسکپ کنتراست دوفاز این اعمال بهتر صورت میگیرد و جسم واضح تر میشود بویژه اینکه اشیا بیولوژیک را بدون رنگ آمیزی میتوان با تفاوت ضریب انکسار و یا اختلاف ضخامت که دارنداز هم متمایز نمود و ساختمان داخل سلول زنده را با کنتراستی که ایجاد میشود بهتر از موقع رنگ آمیزی دید و تشخیص داد و حتی مشاهده حرکت میکروبهها را که در میکروسکپ معمولی بعلت تجمع شدید انوار نورانی ممکن نیست فراهم ساخت.

در میکروسکپ زمینه سیاه اشعه نورانی پس از برخورد با شیئی طوری منعکس یا منکسر میشود که نتوانند از دهانه عدسی جسمی (ابژکتیف) داخل شوند. بنا بر این در زمینه تاریک و سیاه تصویری از اشعه‌ای که از کنارهای جسم انکسار یافته اند تشکیل میشود که در وسط خالی یعنی داخل سلول سیاه مینماید و برای دیدن میکروبهای ریز و جدا از هم مشکلی ایجاد میکند و فقط اجسامی را که در حد وضوح میکروسکپ قرار دارند و یا آگلوتینای میکروبی رامیتوانند واضح نشان دهد در صورتیکه با میکروسکپ

بندرت میکرب تگ و مجزادیده میشود در می‌آیند و در مدت چند ثانیه حرکات مدور و نوسانهای میکربها در این توده‌ها از بین رفته کاملاً بیحرکت میشوند. این آگلوتیناها در میکروسکپ کنتراست دوفاز بصورت تکه‌هایی سیاه دیده میشود.

+++ آگلوتیناها بامختصر تاخیری یعنی بعد از ۱-۲ دقیقه مثل قبل تشکیل میشوند و بطور استثناء ممکن است حرکت میکربها ۳ تا پنج دقیقه باقی بماند و بعد بیحرکت شوند.

++ آگلوتیناها بعد از ۲-۴ دقیقه بدون شك بایستی تشکیل شوند ولی حرکات نوسانی و مدور میکربهای این توده‌ها تا پنج دقیقه هم باقی میماند و بعد کاملاً بیحرکت میشوند. ضمناً تمام میکربها کاملاً بهم نجسیده تعدادی شان مجزا و بی‌حرکت میمانند ولی حرکت سریعشان کاهش یافته است و گاه تغییر شکل و اندازه یافته بعضی شان خیلی بزرگ میشوند.

+ توده شدن میکربها خیلی کند و بطئی و معمولاً بعد از ۴ تا ۵ دقیقه صورت میپذیرد ولی حرکت در این توده‌ها نظیر بسیاری از میکربهای مجزا باقی میمانند و نیز تعداد زیادی از میکربهای متحرکی که تغییر شکل و اندازه یافته اند دیده میشوند. در روش کیفی وقتی نتیجه را مثبت تلقی میکنیم که آگلوتیناسیون بدون شك و تردید بعد از ۳-۴ دقیقه (+) تشکیل شود. در اینصورت میتوان سرم‌ها را بطور کمی به نسبت متصاعدی رقیق نموده و با هر یک از محلولهای سرم نظیر روش کیفی آزمایش بعمل آورد و رقیق‌ترین محلول سرم را که بتواند آزمایش مثبت ایجاد کند عیار نهائی آگلوتیناسیون منظور نمود.

نتیجه:

بمنظور تشخیص و با بکمک میکروسکپ کنتراست دوفاز جد اول خلاصه‌ای از بررسی و مقایسه نتایج و اکنشهای آگلوتیناسیون کلاسیک و سریع را که با ۱۷۴ نمونه ویبریون التور تیپ اینا با انجام شده است و نتایجی که محققین انستیتوی مرکزی مسکوری ۳۰ نمونه ویبریون کلر آ (۲۵) نمونه اوگاوا و پنج نمونه تیپ ویبریون ساپروفیت (که از ایستگاههای تحقیقاتی از پاکستان جمع آوری و مطالعه شده اند یاد آور میشویم.

باشد. این تعلیق میکربی را میتوان از مخلوط کردن چند کلنی که از روی بوآت آگار برداشته ایم در مقدار کمی آب پپتون دار نیز تهیه کرد و یا بجای کشت روی ژلوز از کشت ۴ تا ۶ ساعته ویبریون در آب پپتون دار (غیر از قسمت پرده نازک) و یا حتی بطور مستقیم از ماده‌های اولیه بیماران (استفراغ و مدفوع و غیره) استفاده نموده و آماده کرد.

۲- از نمونه‌های سرهای آگلوتینان ضد و با [۴ و ۸] اوگاوا- اینا با- پلی که بروش سازمان بهداشت جهانی [۷] توسط کارخانه دیفکو آمریکا ساخته شده است [۸ و ۷] در آب پپتون دار یک درصد که $PH = 7.4$ تا ۸ دارد محلول یک پنجاهم و در صورت تعیین کمی عیار محلولهای رقیق تر تهیه مینمائیم (بجای آب پپتون دار میتوان از سرم فیزیولوژیک ۸ تا $PH = 7.4$ هم استفاده کرد).
۳- روی یک لام تمیز بدون چربی در یک سمت باید یک قطره آب پپتونه بعنوان شاهد و در سمت دیگر یک قطره از محلول یک پنجاهم آنتی سرم (در موارد کمی محلولهای رقیق تر) برای آزمایش قرار داد و در هر یک از این دو یک قطره تعلیق میکرب را که با حلقه سیم طلای سفید برداشته ایم مخلوط کرد و روی آن لامل نهاده زیر میکروسکپ کنتراست دوفاز با ابزکتیف ۴۰ نگاه کرد.

۴- بازدید لام از چند ثانیه تا ۵ دقیقه طول میکشد و با حرکت میکرومتر بطور وضوح در قطره شاهد حرکت ویبریونها مشاهده میشود ولی در قطره آزمایش در اثر آگلوتیناسیون و ایموبیلیزاسیون ویبریونها میکربها توده و بی‌حرکت شده و مثل این است که به لام و لامل چسبیده اند.

خواندن نتیجه آزمایش- آگلوتیناسیون و ایموبیلیزاسیون ویبریون کلرا غالباً فوری است و پس از مخلوط کردن ویبریونها با آنتی سرم مربوطه شان ایجاد میشود که بامیکروسکپ کنتراست دوفاز باسانی قابل رؤیت است. نتیجه آگلوتیناسیون را با علامت (+) نشان میدهند که نسبت بشدت مثبت شدن از یک تا چهار باضافه میگذارند بدین ترتیب که:

+++ شدیدترین واکنش را نشان میدهد. ویبریونها از همان ابتدا بصورت توده‌های آگلوتینای کوچک که در بینشان

جدول ۱- مقایسه نتایج واکنش آگلوتیناسیون برای تشخیص سریع ویبریون وبا با ۱۷۴ نمونه ویبریونهای التور تیپ اینا با (تحت بررسی بخش میکروب شناسی)

نمونه ویبریون	آگلوتیناسیون کلاسیک			آگلوتیناسیون وایموبیلیزاسیون سریع با آنتی سرمهای		
	پولی	اینابا	اوساوا	پولی	اینابا	اوساوا
۱-۶	++++	++++	-	۱۶۰۰++++	۴۰۰++++	۵۰-
۷	++++	++++	-	۴۰۰++++	۴۰۰++++	۵۰-
۸-۴۶	++++	++++	-	۱۶۰۰+++	۴۰۰++++	۵۰-
۴۷	++++	++++	-	۸۰۰++++	۴۰۰++++	۵۰-
۴۸-۵۸	++++	++++	-	۱۶۰۰+++	۴۰۰++++	۵۰-
۵۹	++++	++++	-	۸۰۰++++	۴۰۰++++	۵۰-
۶۰-۶۲	++++	++++	-	۱۶۰۰++	۴۰۰++++	۵۰-
۶۳-۱۲۱	++++	++++	-	۱۶۰۰+++	۴۰۰++++	۵۰-
۱۲۲	++++	++++	-	۳۲۰۰++	۴۰۰++++	۵۰-
۱۲۳-۱۵۲	++++	++++	-	۱۶۰۰+++	۴۰۰++++	۵۰-
۱۵۳	++++	++++	-	۳۲۰۰++	۴۰۰++++	۵۰-
۱۵۴-۱۵۷	++++	++++	-	۱۶۰۰++++	۴۰۰++++	۵۰-
۱۵۸-۱۷۴	++++	++++	-	۱۶۰۰+++	۴۰۰++++	۵۰-

تبصره - اعداد ستونها رقت سرمهای ضد وبائی و علامت + شدت واکنش را نشان میدهد .

جدول ۲ - تشخیص سریع ویبریون وبا در ۳۰ نمونه جمع آوری شده در ازبکستان شوروی (۲۵ نمونه اوساوا و ۵ نمونه ویبریون ساپروفیت)

شماره ویبریون	خصوصیات گشت	آگلوتیناسیون کلاسیک با آنتی سرمهای			تشخیص نوع ویبریون	آگلوتیناسیون وایموبیلیزاسیون سریع با آنتی سرمهای			
		OH	O	اوساوا		OH ۱/۶۴۰۰	O ۱/۲۰۰۰	اوساوا ۱/۸۰۰	اینابا ۱/۸۰۰
۱	تی پیک	++++	++++	++++	وبائی	۳۲۰۰++++	۲۰۰++++	۸۰۰++++	۱۰۰+
۲	»	۲۰۰+			ویبریون آسا	۲۰+	۲۰-	۲۰-	۲۰-
۳	»	۲۰۰+	۲۰۰+		»	۲۰+	۲۰+	۲۰-	۲۰-
۴	»	۱۰۰+	۱۰+	۱۰+	»	۲۰-	۲۰-	۲۰-	۲۰-
۵	»	۱۰-	۱۰-	۱۰-	»	۲۰+	۲۰-	۲۰-	۲۰-
۶	کلنی کدر شکل R	۱۰۰-	۱۰۰-	۱۰۰-	»	۲۰+	۲۰-	۲۰-	۲۰-
۷	تی پیک	++++	++++	++++	وبائی	۳۲۰۰++++	۲۰۰++++	۸۰۰++++	۲۰-
۸-۱۹	»		++++	++++	»		۲۰۰++++	۸۰۰++++	
۲۰	»		++++	++++	»		۲۰۰++++	۸۰۰++++	
۲۱	»		++++	++++	»		۴۰۰++++	۸۰۰++++	
۲۲	»		++++	++++	»		۴۰۰++++	۱۶۰۰++++	
۲۳	»		++++	++++	»	۶۴۰۰++++	۴۰۰++++	۸۰۰++++	
۲۴	»	++++	++++	++++	»	۶۴۰۰++++	۴۰۰++++	۸۰۰++++	
۲۵	»	++++	++++	++++	»	۳۲۰۰++++	۲۰۰++++	۸۰۰++++	
۲۶	کلنی کدر شکل O		++++	++++	»		۲۰۰++++	۸۰۰++++	
۲۷	تی پیک		++++	++++	»		۲۰۰++++	۸۰۰++	
۲۸	کلنی کدر شکل S		++++	++++	»		۴۰۰++++	۸۰۰++	
۲۹	کلنی شفاف شکل O	++++	++++	++++	»		۲۰۰++++	۸۰۰++++	۲۰-
۳۰	کلنی کدر شکل R	++++	++++	++++	»		۲۰۰++++	۸۰۰++++	۲۰۰+
ویبریون مچینکف	تی پیک	++++			-	۸۰++++	۲۰-	۲۰-	۲۰-

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:47 IRST on Tuesday March 20th 2018

بحث :

چنانکه ازجداول فوق برمیآید:

۱- تقریباً تمام سوشهای ویبریون وبای حقیقی بطور اختصاصی بارقت نهائی عیار آنی سرمهای مربوط بخود ایجاد آگلوتیناسیون بشدت +++ یا ++++ مینمایند اگر چه بعضی از این سوشها قدرت آگلوتینه شدن کمتر یا بیشتری (نصف یا دو برابر عیار نهائی سرم) نسبت به دیگر سوشها نشان میدهند با وجود این چون درحد میزان قابل قبول برای تشخیص است اشکالی در عمل ایجاد نخواهند کرد. (نظیر سوشهای ۱ و ۷ و ۲۵ و ۲۳ و ۲۴).

۲- سوشهای ویبریون ساپروفیت با آنکه در روش کلاسیک آگلوتیناسیون مختصری به نسبت $\frac{1}{10}$ یا $\frac{1}{3}$ با سرمهای وبائی دارند ولی در کنتراست دوفاز با این سرمها آگلوتینه نشده اند که خود دلیل بر اختصاصی بودن و حساسیت روش سریع است. (نظیر سوشهای ۲ تا ۶).

۳- انجام آزمایش سریع بر خلاف روش کلاسیک که ۲ تا ۱۸ ساعت وقت برای تشخیص لازم دارد بیش از ۵ تا ۱۰ دقیقه طول

نمیکشد و نیز برای بررسی و مطالعه ویبریون کلر آ به ۲ تا ۳ کلنی که از روی کشت ژلوز یا آبگوشت ۶ ساعته جدا شده باشد بیشتر احتیاج نیست و حتی در بعضی موارد میتوان بطور مستقیم از مواد طبیعی بیمار که به آزمایشگاه رسیده است و یا بر بالین بیمار برداشت نمائیم و مورد استفاده قرار دهیم. همچنین چون آنی سرمهای ضد وبا نسبتاً گران تهیه میشود روش سریع که احتیاج به مقدار کم ورقت نهائی عیار سرم دارد مقرون بصرفه است.

خلاصه :

۱- تشخیص سریع وبا بکمک میکروسکپ کنتراست دوفاز و آگلوتیناسیون با سرمهای اختصاصی ضد وبائی سریع و اختصاصی و آسان است و مزیت بیشتر نسبت به میکروسکپ زمینه سیاه دارد.
۲- با همین روش ۱۷۴ نمونه ویبریون التور نوع اینا با (بخش میکروشناسی دانشکده پزشکی) و ۳۰ نمونه ویبریون وبا را که از ایستگاههای مختلف تحقیقاتی از بکستان شوروی جمع آوری شده بودند (۲۵ نمونه نوع التورتیب او گاوا و پنج نمونه ویبریون ساپروفیت) [۴] شناخته شده اند.

REFERENCES

1. Konrad, Diem: Documenta Geigy, Copyright. 656. Geigy. 1968
2. Gallut, H., Cour de Microbiologie de L' Institut Pasteur Paris, 417, 1969
3. Benenson, A. S., Bull. WHO., 30: 827, 1964.
4. Ermolieva, Z. V., Mikrobiol. Zh (Moskova), 44: 18, 1967.
5. Gallut, J., Bull. Inst. Pasteur., 66: 219, 1968.
6. Policart, E., Bessin, M., Traite de microscopie, 95, Masson et Cie, Paris. 1957.
7. Babis, J., Bull. WHO., 18: 275, 1958.
8. Mukherjee, B., J. Path. Bact., 91. 256, 1965.