

COMPARAÇÃO ENTRE O *CALIFORNIA MASTITIS TEST* E A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS COMO MÉTODOS AUXILIARES PARA O DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA POR *Staphylococcus aureus* E *Corynebacterium SPP.*¹

LUIZ FRANCISCO ZAFALON², ANTÔNIO NADER FILHO³, JOSÉ VÍCTOR OLIVEIRA⁴, FLÁVIO DUTRA RESENDE⁴

¹Recebido para publicação em 29/11/04. Aceito para publicação em 28/03/05.

²CAPTA Bovinos de Leite, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Caixa postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP.
E-mail: zafalon@iz.sp.gov.br

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP.

⁴Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Av. Rui Barbosa s/n.º, Caixa postal 35, CEP 14770-000, Colina, SP.

RESUMO: Foram estudadas as provas de California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) como métodos auxiliares para o diagnóstico da mastite subclínica bovina na identificação de quartos mamários doentes em que *Staphylococcus aureus* e microrganismos do grupo *Corynebacterium* foram isolados posteriormente. Tanto o CMT como a CCS apresentaram maior sensibilidade diagnóstica quando o *S. aureus* era o agente isolado das amostras de leite, quando comparado ao *Corynebacterium* (88,6% e 86,1% contra 49,1% e 59,1%, respectivamente). A eficiência diagnóstica de ambas as provas foi maior quando a mastite subclínica era causada por *S. aureus*, ao comparar-se este microrganismo com o isolamento de *Corynebacterium* (81,0% e 87,1% contra 60,5% e 76,7%, respectivamente). O CMT e a CCS demonstraram uma relação linear nos quartos mamários em que ocorreu o isolamento de *S. aureus*, não acontecendo o mesmo para os quartos mamários que apresentavam mastite subclínica por *Corynebacterium spp.*

Palavras-chave: California Mastitis Test, Contagem de células somáticas, *Corynebacterium*, mastite bovina, *Staphylococcus aureus*.

COMPARISON BETWEEN CALIFORNIA MASTITIS TEST AND SOMATIC CELLS COUNT AS AUXILIARY METHODS FOR DIAGNOSIS OF THE BOVINE SUBCLINICAL MASTITIS BY *Staphylococcus aureus* AND *Corynebacterium SPP.*

ABSTRACT: California Mastitis Test (CMT) and somatic cells count (SCC) were studied as auxiliary methods for diagnosis of the bovine subclinical mastitis in the identification of ill mammary quarters where *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium* were isolated later. CMT and SCC showed higher diagnostic sensitivity when *S. aureus* was the microorganism isolated from milk samples compared to the *Corynebacterium* (88.6% and 86.1% against 49.1% and 59.1%, respectively). The diagnostic efficiency of the tests were both higher when subclinical mastitis was caused by *S. aureus*, compared to the *Corynebacterium* (81.0% and 87.1% against 60.5% and 76.7%, respectively). CMT and SCC demonstrate a linear relationship in the mammary quarters where *S. aureus* was isolated. The same result was not exhibit when *Corynebacterium spp.* was isolated.

Key words: California Mastitis Test, somatic cells count, *Corynebacterium*, Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

A inflamação da glândula mamária é quase sempre de caráter infeccioso e dentre os agentes etiológicos isolados de casos de mastite subclínica destacam-se os estafilococos coagulase positivos, entre eles o *Staphylococcus aureus* e as bactérias do gênero *Corynebacterium*, o primeiro considerado como o mais importante patógeno da glândula mamária, enquanto o *Corynebacterium* spp apresenta-se como um dos microrganismos mais prevalentes (LEVAN *et al.*, 1985; NADER FILHO *et al.*, 1985; FERNANDES, 1992; COSTA *et al.*, 1996; MENDONÇA *et al.*, 1999).

A contagem de células somáticas (CCS) e o *California Mastitis Test* (CMT) são métodos auxiliares que podem ser utilizados para o diagnóstico da forma subclínica da doença. Entretanto, cuidados devem ser tomados com diferenças individuais, variações diurnas, período de lactação e processos irritativos devido às falhas no equipamento e no manejo de ordenha (SHELDRAKE *et al.*, 1983; Barros e LEITÃO, 1992; HARMON, 1994; WILSON *et al.*, 1995).

O termo “células somáticas do leite” é utilizado para designar todas as células presentes no leite, incluindo aquelas de origem sangüínea (leucócitos) e células de descamação do epitélio glandular secretor. Durante a mastite ocorre o aumento do número de células somáticas no leite pela maior passagem de leucócitos do sangue para a glândula mamária, com maior descamação do epitélio lesado (FONSECA e SANTOS, 2000).

O CMT, por sua vez, é considerado um teste subjetivo que pode produzir resultados falso-positivos ou falso-negativos e a sua interpretação pode colocar em risco programas de controle da doença pela possibilidade de se identificar um número considerável de animais ou quartos mamários doentes como normais (BRITO *et al.*, 1997).

O objetivo deste trabalho foi o de comparar a CCS e o CMT como testes diagnósticos auxiliares para a mastite subclínica bovina causada por *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* spp, uma vez que estes grupos de microrganismos podem causar respostas inflamatórias diferentes na glândula mamária, confundindo técnicos e/ou produtores de leite na identificação de casos subclínicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais faziam parte de uma propriedade rural produtora de leite tipo C com ordenha realizada mecanicamente, uma vez ao dia, pela manhã, sendo utilizado o sistema de “balde ao pé”. A população bovina era constituída por animais da raça Holandesa preto e branca e as amostras de leite pertenciam a animais que se encontravam entre o décimo dia depois do parto e um mês antes da seca-gem.

As vacas em lactação foram acompanhadas de maio de 2000 até maio de 2002, com a entrada de novos animais na linha de ordenha durante o trabalho. Assim, no período de tempo em que foi realizada a colheita das amostras, a população de animais em lactação era sempre constituída por 40 a 50 vacas.

As amostras de leite submetidas ao CMT e à CCS estão relacionadas com quartos infectados por *S. aureus* e *Corynebacterium* spp., mais os quartos contralaterais sadios. Dessa maneira, o grupo dos quartos em que as amostras de leite foram submetidas ao CMT originaram-se de 554 quartos mamários, com isolamento de *S. aureus* e sadios, além de 76 quartos com isolamento de *Corynebacterium* spp e sadios, enquanto as amostras de leite submetidas à CCS originaram-se de 233 quartos mamários em que houve o isolamento de *S. aureus*, mais os quartos sadios, além de outros 43 quartos mamários com isolamento de *Corynebacterium* spp. mais os quartos mamários sadios.

As amostras de leite foram colhidas em duplicatas, de acordo com recomendações do “National Mastitis Council” (1990). A fração de leite utilizada para analisar o CMT e a CCS foi a inicial, representada pelos primeiros jatos. Durante o período de estudo, não foram colhidas amostras de leite provenientes de quartos mamários já utilizados em colheitas anteriores, porém, em algumas colheitas, o leite utilizado foi o de animais já estudados anteriormente.

O CMT foi efetuado de acordo com SCHALM e NOORLANDER (1957), sendo que as misturas (leite + reagente) consideradas positivas foram as que apresentaram formação de gel viscoso, acompanhadas ou não pela coloração violeta, atribuindo-se escores que variaram de “dois” a “cinco”, de acordo com o

grau de resposta inflamatória. As misturas que permaneceram inalteradas, ou seja, sem a clara evidência de viscosidade, foram consideradas negativas, atribuindo-se o escore "um".

A CCS foi realizada pela contagem direta em microscópio óptico em objetiva de imersão (NMC, 1968). Utilizou-se o método de Broadhurst & Paley, indicado por SANTOS e VILELA (1983), no qual as lâminas foram mergulhadas no corante por um período mínimo de cinco até oito segundos. Todas as células com núcleo como também aquelas com mais da metade do corpo celular dentro do campo mi-

croscópico foram contadas em 100 campos microscópicos distintos, com os resultados obtidos multiplicados pelo fator de trabalho do microscópio que foi utilizado na investigação (Fator de Trabalho igual a 3.929,8). Foram consideradas positivas as contagens iguais ou superiores a 200.000 células / mL de leite.

As determinações da sensibilidade, especificidade e eficiência foram realizadas de acordo com o modelo proposto por MEDRONHO e PEREZ (2002), conforme ilustra os dados constantes do Quadro. 1.

Quadro 1. Possíveis resultados de um teste diagnóstico para a identificação de uma doença

	Doença		Total
	Presente	Ausente	
Teste Positivo	a (Verdadeiro positivo)	b (Falso positivo)	a + b
Teste Negativo	c (Falso negativo)	d (Verdadeiro negativo)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

A sensibilidade, a especificidade e a eficiência foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Eficiência} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

As colheitas das amostras de leite foram realizadas de acordo com as normas de assepsia propostas por VEISSEYRE (1972), em tubos com tampas rosqueáveis esterilizados, transportados até o laboratório sob refrigeração. As amostras foram semeadas sobre a superfície de placas contendo ágar com 5% de sangue de ovino (Ágar base - Oxoid®, Hampshire, Inglaterra) para a realização do isolamento e identificação das cepas de *S. aureus* (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1990; HOLT *et al.*, 1994).

As colônias que evidenciaram formas circulares,

brancas, cremes ou opacas em ágar sangue, até o período máximo de 48 horas de incubação a 37°C, reconhecidas como bastonetes Gram-positivos pleomórficos que apresentavam-se sob a forma de paliçada e "letras chinesas", foram submetidas às provas para diferenciação entre *Corynebacterium* e *Arcanobacterium pyogenes* (catalase, Litmus milk, hemólise) (CARTER, 1978).

A diferença no número de quartos mamários estudados para os agentes etiológicos em questão deveu-se à prevalência dos mesmos na propriedade. O diagnóstico microbiológico foi definido para validação dos testes diagnósticos estudados (SCHMIDT e DUNCAN, 1999).

Foi realizada a análise da regressão linear entre a CCS e o CMT do leite dos quartos mamários sadios e para os quartos com mastite subclínica por *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* spp., somente naqueles casos em que houve a realização de ambas as provas para o mesmo quarto (SAMPAIO, 1998). O modelo estatístico utilizado para a análise de regressão foi representado pela equação:

$$Y = a + b.x$$

Onde Y = observação referente à contagem de células somáticas (\log^{10}); a = coeficiente linear da regressão; b = coeficiente de regressão do escore do CMT sobre a resposta Y (contagem de células somáticas); x = escore do CMT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à diversidade da etiologia infecciosa da

mastite, os testes diagnósticos podem gerar resultados diferentes de acordo com o microrganismo responsável pela doença devido à maneira como cada quarto mamário reage e é afetado por determinado agente etiológico.

Os dados referentes à avaliação da sensibilidade, especificidade e eficiência dos testes diagnósticos encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2. Avaliação do *California Mastitis Test* (CMT) e da contagem de células somáticas (CCS) como métodos diagnósticos da mastite subclínica bovina por *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* spp

Microrganismos	Teste diagnóstico	Sensibilidade	Especificidade	Eficiência
<i>S. aureus</i>	CMT	88,6	77,0	81,0
<i>Corynebacterium</i>	CMT	49,1	87,0	60,5
<i>S. aureus</i>	CCS	86,1	88,3	87,1
<i>Corynebacterium</i>	CCS	59,1	95,2	76,7

Ao serem observados os resultados no Quadro 2, verificou-se que o CMT (88,6%) e a CCS (86,1%) apresentaram maior sensibilidade para o diagnóstico da mastite subclínica por *S. aureus*, quando comparada com a mastite subclínica por *Corynebacterium*. Quando o *Corynebacterium* era o agente etiológico envolvido, a especificidade foi superior à observada para o *S. aureus* para as duas provas estudadas. O teste mais específico no diagnóstico da mastite subclínica por *S. aureus* e *Corynebacterium* foi a CCS, com 88,3% e 95,2%, respectivamente, assim como a prova de maior eficiência com 87,1% e 76,7%, respectivamente.

O CMT e a CCS demonstraram ser mais eficientes para diagnosticar a mastite subclínica por *S. aureus* do que a mastite por *Corynebacterium*. Segundo DOANE *et al.* (1987), o *Corynebacterium* provoca elevação no número de células somáticas, porém a contagem fica abaixo das 200.000 células/mL, um valor que para estes autores não estava associado com alterações na composição do leite ou diminuição da produção láctea. No presente trabalho, o número de 200.000 células/mL de leite foi utilizado como “divisor” entre quartos doentes e sadios, o que explica a menor sensibilidade da CCS para o *Corynebacterium* e, conseqüentemente, para o CMT, cujas leituras se fundamentam de acordo com o número de células presentes.

Na realização do CMT, o fato de serem considerados todos os escores em que ficou demonstrada viscosidade, diminuiu o risco de quartos com mastite subclínica por *S. aureus* serem identificados como normais. Este fator, quando adotado, é de maior valia para programas de controle da doença. Porém, tal fato não foi observado quando o *Corynebacterium* estava envolvido, já que o teste demonstrou uma baixa sensibilidade para este microrganismo.

Entretanto, ainda existe a possibilidade de quartos mamários com escore negativo ao CMT apresentarem infecção por patógenos da mastite como *S. aureus*, considerado como um patógeno primário, podendo constituir-se em uma importante fonte de infecção para o rebanho. Isto implica na necessidade de examinar a possibilidade de quartos mamários estarem com mastite subclínica com diferentes métodos diagnósticos e não somente com um único (BRITO *et al.*, 1999).

Neste sentido, COSTA *et al.* (1998) encontraram uma concordância de 65,4% entre o CMT e a condutividade elétrica. Para os mesmos autores, a sensibilidade do teste de condutividade elétrica do leite, quando comparado com o isolamento microbiológico, foi de 28,6%, com especificidade de 87,4%. Comparando-se o CMT com o isolamento

microbiológico, a sensibilidade foi de 53,6% e a especificidade de 85,5%.

A relação linear entre a CCS (expressa em \log^{10}) e o CMT nos quartos mamários sadios foi representada pela equação $Y = 4,1693 + 0,4504x$, com a demonstração gráfica apresentada na Figura 1.

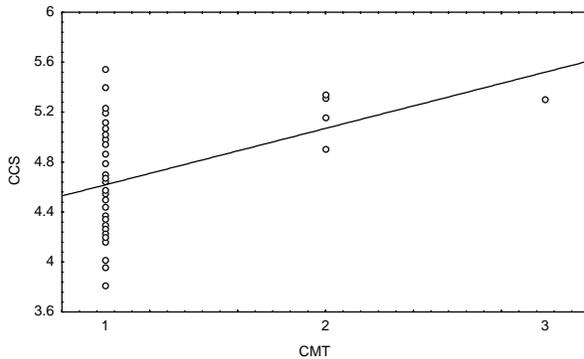


Figura 1. Representação gráfica da relação linear entre CMT e CCS (\log^{10}) para os quartos mamários sadios ($p = 0,0015$)

Na equação que representou a relação linear entre a CCS e o CMT para os quartos mamários sadios, ao substituir-se o valor de “x” pelo escore igual a “2” para o CMT, ao contrário do considerado neste trabalho em que apenas o escore “1” foi tratado como negativo, a CCS seria aproximadamente 120.000 células/mL de leite. Este é um valor que, de acordo com o trabalho, estaria dentro do limite de normalidade para CCS e que poderia aumentar a especificidade do CMT, porém, em contrapartida, acarretaria a redução da sensibilidade do teste.

A relação linear para os quartos mamários com mastite subclínica por *S. aureus* entre a contagem de células somáticas (expressa em \log^{10}) e o CMT foi demonstrada pela equação $Y = 4,6919 + 0,2904x$. A representação gráfica encontra-se na Figura 2.

Ao substituir-se o valor de “x” pelo escore de CMT, na equação que demonstrou a relação linear entre CCS e CMT em quartos com mastite subclínica por *S. aureus*, o escore “2” esteve bem próximo ao limite estimado de 200.000 células/mL de leite, adotado como limiar entre quarto sadio e quarto doen-

te (aproximadamente 190.000 células/mL de leite). As elevadas sensibilidades para estes dois testes na mastite por *S. aureus* demonstraram ser este escore e este limiar adequados para considerar um quarto como doente, mesmo que o escore “2” do CMT seja representado apenas por uma ligeira viscosidade.

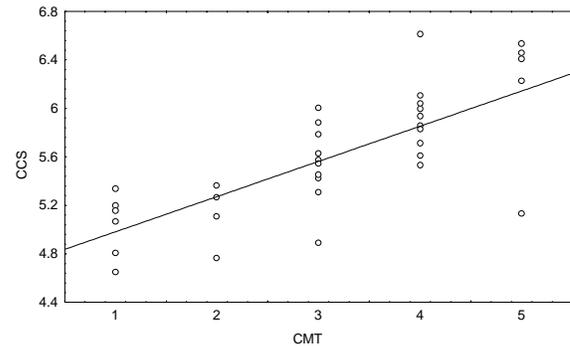


Figura 2. Representação gráfica da relação linear entre CMT e CCS (\log^{10}) para os quartos mamários com mastite subclínica por *S. aureus* ($p < 0,01$)

Na equação, a substituição do valor “x” por um escore superior a “2” para o CMT, demonstraria aumento da sua sensibilidade no diagnóstico da mastite subclínica por *S. aureus* nos quartos estudados, mas poderia também acarretar uma redução da eficiência do mesmo devido à provável diminuição da especificidade do teste, oposto ao observado para os quartos sadios. Convém ressaltar o relato de PFEIFFER (1999), lembrando que durante a fase inicial de um programa de controle de quaisquer doenças e entre elas podemos citar a mastite subclínica bovina, a sensibilidade de um teste diagnóstico é considerada como a característica mais importante para garantir que todos os animais doentes em um rebanho estejam sendo detectados. Porém, quando se tem uma baixa prevalência da doença, a especificidade torna-se mais importante e um segundo teste diagnóstico pode ser conduzido para aumentar a capacidade de identificação de animais não doentes.

Não foi demonstrada relação linear entre a CCS e o CMT para os quartos mamários com mastite subclínica por *Corynebacterium* spp.

CONCLUSÕES

A CCS e o CMT apresentaram eficiência superior para o diagnóstico da mastite subclínica quando o *S. aureus* era isolado posteriormente, ao comparar-se com as amostras de leite em que o *Corynebacterium* spp era isolado. Quando consideradas apenas as bactérias do grupo *Corynebacterium*, a CCS foi a prova mais eficiente para o diagnóstico da mastite subclínica. A adoção do número de 200.000 células/mL de leite demonstrou ser este um limiar adequado para o diagnóstico da mastite subclínica por *S. aureus* na propriedade, assim como o escore “2” para o CMT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, G.C.; LEITÃO, C.H. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. *Pesq. Vet. Bras.*, Porto Alegre, v.12, p.45-48, 1992.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, Belo Horizonte, v.51, n.2, p.129-135, 1999.
- BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R.S. et al. Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. *Pesq. Vet. Bras.*, Belo Horizonte, v.17, n.2, p.49-53, 1997.
- CARTER, G.R. *Diagnostic procedures in veterinary microbiology*. 2.ed. Illinois: Charles C. Thomas. 1978. p.113.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R. et al. Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. *Prev. Vet. Med.*, v.29, p.151-155, 1996.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; GARINO JR, F. et al. Avaliação da condutibilidade elétrica do leite de glândula mamária com mastite: correlação com CMT e exames microbiológicos. *Napgama*, São Paulo, v.1, n.1, p.3-8, 1998.
- DOANE, R.M.; OLIVER, S.P.; WALKER, R.D. et al. Experimental infection of lactating bovine mammary glands with *Streptococcus uberis* in quarters colonized by *Corynebacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg., v.48, n.5, p.749-754, 1987.
- FERNANDES, J.C.T. Agentes etiológicos de mastite bovina no Rio Grande do Sul no período 1972-1989. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, v.20, p.150-163, 1992.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Contagem de Células somáticas. In: FONSECA, L.F.L., SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p.49-58.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cells count. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.77, p.2103-2112, 1994.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.544-551.
- LEVAN P.L.; EBERHART, R.J.; KESLER, E.M. Effects of natural intramammary *Corynebacterium bovis* infection on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.68, n.12, p.3329-3336, 1985.
- MEDRONHO, R.A.; PEREZ, M.A. Testes diagnósticos. In: MEDRONHO, R.A. et al. *Epidemiologia*. 1.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. p.259-270.
- MENDONÇA, C.L.; FIORAVANTI, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A. et al. Etiologia da mastite bovina. *Vet. Not.*, v.5, n.1, p.107-118, 1999.
- NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JÚNIOR, O.D. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, Porto Alegre, v.5, n.2, p.53-56, 1985.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Subcommittee on Screening Tests. Direct microscopic somatic cell count in milk. *J.of Milk and Food Technol.*, Orange, v.31, n.1, p.350-354, 1968.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington : The National Mastitis Council Inc., 1990. 34 p.
- PFEIFFER, D.U. *Veterinary Epidemiology - An introduction*. Royal Veterinary College, London: University of London, 1999. 61 p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

- SANTOS, E.C.; VILELA, M.A.P. Pesquisa de células somáticas no leite cru como critério de avaliação de qualidade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, Belo Horizonte, v.35, n.6, p.907-919, 1983.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg., v.130, p.199-207, 1957.
- SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B. Epidemiologia clínica e a medicina embasada em evidências. In: ROUQUAYROL, M.Z., ALMEIDA FILHO, N. *Epidemiologia e Saúde*. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 600 p.
- SHELDRAKE, R.F.; HOARE, R.J.T.; MCGREGOR, G.D. Lactation stage, parity and infection affecting somatic cells, electrical conductivity and serum albumin in milk. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.66, n.543-547, 1983.
- VEISSEYRE, R. *Lactologia Técnica*. Zaragoza: Acribia, 1972. 629 p.
- WILSON, D.J.; STEWART, K.N.; SEARS, P.M. Effects of stage of lactation, production, parity and season on somatic cell counts in infected and uninfected dairy cows. *Small Rum. Res.*, Amsterdam, v.16, p.165-169, 1995.