

Estudio sobre agentes etiológicos de vaginitis en la mujer grávida costarricense *

por

Luis E. Solano S. **

(Recibido para su publicación el 28 de febrero de 1953)

Durante mi tiempo de servicio en el Laboratorio Bacteriológico del Instituto Materno-Infantil Carit, pude darme cuenta de la alta incidencia de *Trichomonas vaginalis* y blastosporados, así como del escaso número de infecciones por *Neisseria*, en pacientes embarazadas padeciendo de vaginitis.

Comprendiendo el poco valor que en nuestro medio se ha dado a dichas infecciones, decidí emprender un estudio sobre etiología de vaginitis durante el embarazo, excluyendo las infecciones causadas por *Neisseria*.

Son cuatro los factores que intervienen en la normalidad y estado infeccioso de la vagina humana: a) número de capas epiteliales; b) contenido de glucógeno de la mucosa; c) acidez, y d) flora bacteriana.

El epitelio vaginal se encuentra en continua regeneración y cubierto por una secreción ácida normal. Su proceso regenerativo asume la mayor intensidad durante la pubertad con la iniciación de las influencias hormonales ováricas, estado que normalmente se mantiene hasta el climaterio en que ocurre su degeneración. Esta mucosa en estado normal es muy rica en glucógeno, acentuándose su contenido durante la madurez sexual. (7).

Se ha demostrado que cuando la estrina está presente en la mucosa vaginal, ésta está formada de muchas capas ricas en glucógeno. En ausencia de estrina, durante la niñez o la menopausia, la mucosa vaginal contiene pocas capas de glucógeno y mantiene una reacción alcalina o neutra. (5).

(*) Trabajo realizado en el Laboratorio Bacteriológico del Instituto Materno-Infantil Carit y en el Laboratorio Clínico de la Sección de Microbiología de la Universidad Nacional.

(**) Sub-Jefe del Laboratorio Bacteriológico Central de la Caja Costarricense del Seguro Social.

El glucógeno de la mucosa vaginal es convertido en azúcares simples y posteriormente en ácido láctico, el que constituye la principal causa de la acidez vaginal normal. Generalmente se acepta al lactobacilo de Döderlein como causante de esta transformación. Otros autores consideran el ácido láctico formado como producto de enzimas presentes en la vagina y, finalmente, otros consideran la acción conjunta de lactobacilos y enzimas, en las que intervienen además otras bacterias en el desdoblamiento de carbohidratos. (7).

Se considera como flora vaginal normal al bacilo descubierto por Döderlein en 1894 (clasificado en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology como *Bacillus vaginae*). Este organismo aparece en la vagina de infantes poco antes del nacimiento, pero poco tiempo después es reemplazado por una flora de estafilococos, estreptococos y bacilos coliformes. Dicha flora bacteriana persiste hasta la pubertad, época en que, debido a las secreciones ováricas, se le facilita su medio y aparece nuevamente, manteniéndose entonces siempre que estén presentes los otros factores mencionados. Así pues, el lactobacilo de Döderlein crea un mecanismo de defensa contra las infecciones vaginales humanas. In vitro, *E. coli*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Trichomonas* y otros microorganismos no crecen en medios similares al vaginal (pH 4.0 -4.5). (7).

De esa manera, cualquier anormalidad en alguno de los cuatro factores que colaboran en la defensa es suficiente para crear susceptibilidad a invasiones vaginales, declarándose el estado infeccioso cuando hay evidencia de "hipoacidez", "hipo-glucógeno", "hipo-Döderlein" o "hipoepitelio". (7).

MATERIAL Y METODO

Se procedió a la toma de frotis vaginales de 300 pacientes embarazadas, que visitaban por primera vez la Consulta Prenatal del Instituto-Materno Infantil Carit.

Las pacientes embarazadas fueron todas de oficios domésticos con excepción de tres que eran costureras, habitantes tanto de la ciudad de San José como de los cantones vecinos. Los tiempos de embarazo fluctuaron de uno a nueve meses.

El plan general que se siguió fué el siguiente:

1. Toma de la muestra y observación de caracteres vaginales.
2. Investigación de *Trichomonas vaginalis*.
3. Siembra para investigación de organismos del género *Candida*.
4. Aislamiento de la flora bacteriana por plateos sobre medio base para agar sangre.
5. Determinación del pH de la muestra.
6. Determinación del contenido de glucógeno de la muestra.
7. Examen microscópico de la muestra, utilizando la coloración de Gram.

1. TOMA DE LA MUESTRA Y OBSERVACION DE CARACTERES VAGINALES:

El material vaginal se obtuvo frotando las paredes vaginales por medio de torundas estériles en número de dos para cada paciente: una de ellas en seco y la otra humedecida en solución salina al 0.9 % para la investigación de *T. vaginalis*. Se tomó nota de los caracteres vaginales.

2. INVESTIGACION DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*:

Se efectuó por examen microscópico a fresco suspendiendo la muestra en solución de cloruro de sodio al 0.9 % a pH neutro (para la investigación a la vez del grado de acidez).

3. SIEMBRA PARA INVESTIGACION DE ORGANISMOS DE GENERO *CANDIDA*:

Para aislar estos organismos se hizo siembra directamente con la torunda en el medio de agua de coco descrito por PICADO (8) y de características muy similares al descrito por Raulin, pero modificado a un pH alrededor de 3, ya que los microorganismos presentes en la vagina humana, en especial los del género *Micrococcus*, son capaces de crecer a un pH muy bajo. (3-3.5). Comprobada la presencia de blastosporados, se hizo siembra por plateo sobre el medio de agar agua de coco de PICADO (8), con un pH 4.5, haciendo luego trasplantes de colonias típicas a medio de Sabouraud maltosado. La temperatura de incubación en todos los medios mencionados fué la ambiente.

La identificación específica se hizo en la siguiente forma:

a) Producción de ascosporas:

Utilizando el medio de zanahoria y búsqueda de éstas al cabo de uno y dos meses por medio de la coloración de Kufferath.

b) Pruebas de fermentación:

Utilizando el método del zimograma de Guerra: Solución de agua peptonada al 1 % y azúcares al 2 % sellando por medio de parafina. Los azúcares probados fueron los siguientes: glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa.

c) Utilización de sustancias azucaradas:

Utilizando el método auxanográfico (6) en la siguiente forma para el medio base:

fosfato mono-potásico	100 mgms.
sulfato de magnesio	50 mgms.
gelosa no lavada	2 gms.
agua destilada	100 cc.

Los azúcares probados fueron: glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa.

4. AISLAMIENTO DE LA FLORA BACTERIANA POR PLANTEOS SOBRE MEDIO BASE PARA AGAR SANGRE:

El medio base para agar sangre, es recomendado para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (3). Las siembras se efectuaron por estrías directamente con la torunda. La incubación a 37°C fué realizada en condiciones aerobias.

Seleccionadas las colonias y sembradas en caldo nutritivo, con previa observación de morfología, se procedió a la identificación específica, siguiendo las claves dadas por la sexta edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1) y la descripción de la tribu *Mimae* de GEORGE G. DE BORD (2).

No se identificó la *Mima polymorpha* var. *oxidans* por haber obtenido las llaves de clasificación, ya cuando el trabajo se encontraba muy avanzado.

5. DETERMINACION DEL pH DE LA MUESTRA:

Para ello se hizo uso del indicador universal de Bogen (4) suspendiendo la muestra en solución de cloruro de sodio al 0.9 % con un pH neutro (pH 7).

6. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GLUCOGENO DE LA MUESTRA:

Su determinación se hizo suspendiendo parte del contenido de la muestra en solución de lugol doble, con posterior examen microscópico para observar la coloración tomada por las células epiteliales.

7. EXAMEN MICROSCOPICO DE LA MUESTRA UTILIZANDO LA COLORACION DE GRAM:

Se hizo uso de la coloración de Gram y se investigó presencia y número de leucocitos, células epiteliales, lactobacilos de Döderlein y demás flora bacteriana existente.

RESULTADOS OBTENIDOS:

De acuerdo a los resultados obtenidos se han dividido las pacientes estudiadas en los siguientes grupos:

1. Pacientes normales.
2. Pacientes con infecciones leves sin vaginitis.
3. Pacientes con infecciones graves y vaginitis.
 - a) Infección por *Trichomonas vaginalis*.
 - b) Infección por *Candida albicans*.
 - c) Infección mixta por *Trichomonas vaginalis* y *Candida albicans*.
 - d) Infección por *Escherichia coli*.
4. Vaginitis no determinadas (Tabla I).

1. PACIENTES NORMALES:

De las 300 pacientes embarazadas estudiadas, 94 de ellas pueden considerarse normales, ya que no presentaron disturbios vaginales. El pH fué de 4 y había abundante contenido de glucógeno en su mucosa lo mismo que de lactobacilos de Döderlein.

Por medio de los cultivos efectuados se aislaron además los siguientes microorganismos:

<i>Micrococcus epidermidis</i>	31
<i>Micrococcus flavus</i>	8
<i>Micrococcus candidus</i>	2
<i>Micrococcus aurantiacus</i>	5

Micrococcus epidermidis, no patógeno, tiene como habitat normal la piel y las membranas mucosas y es capaz de crecer a la acidez mencionada. Su aislamiento puede deberse también a su presencia en las paredes vulvares, que contamina la torunda al momento de la toma de muestra.

cópico de preparación coloreada al Gram y en la paciente que lo presentó se aisló también *Candida krusei*, organismo que se encuentra frecuentemente en la piel y membranas mucosas y es considerado como no patógeno.

En los demás casos de *C. krusei* de las pacientes de este grupo, el pH fué 4.5 y se acompañó de *Micrococcus*.

Los *Streptococcus sp.* aislados no son hemolíticos. Sus caracteres no coincidieron con las llaves principales dadas por el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1).

En una de las pacientes en que se aisló *Mima polymorpha*, ésta apareció al examen microscópico de la secreción coloreada con Gram, como un coco-bacilo Gram negativo intracelular.

No se encontró ninguna relación en cuanto a meses de embarazo.

3. PACIENTES CON INFECCIONES GRAVES Y VAGINITIS:

a) INFECCION POR *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Setenta y tres pacientes (24.3 %) (Tablas I y II) presentaron este protozooario sin asociación a ningún otro organismo considerado como patógeno. Dieciséis pacientes que presentaron *T. vaginalis* acompañada de *C. albicans*, son consideradas por aparte. (Tabla II).

De las 73 pacientes, 69 presentaron un flujo abundante, acompañándose de vaginitis y asociado muy frecuentemente de enrojecimiento de la mucosa y de prurito vulvar.

Las 4 restantes no presentaron flujo y manifiestan no tenerlo. Tampoco presentan anormalidades vaginales. El pH es 4.5 para tres y pH 5 para la restante. El contenido de glucógeno es abundante en dos de ellas. Los leucocitos son escasos y se aíslan de ellas *Herella vaginalis* y *Mima polymorpha*. Se observan lactobacilos de Döderlein en dos.

En las 69 pacientes con vaginitis, todas presentan flujo que va de escaso a abundante, prevaleciendo el color amarillo. Una de ellas tiene además ulceraciones en las paredes vaginales.

Dicha infección se presenta por igual en todos los meses de embarazo. No se observa ninguna relación a edad, pero sí su mayor frecuencia en multíparas que en primíparas.

El pH fluctúa de 4.5 a 6 (Tabla III). El contenido de glucógeno es escaso en la mayoría.

El flujo presenta un número alto de leucocitos y se aíslan los siguientes microorganismos aerobios asociados con la infección:

<i>Micrococcus epidermidis</i>	42
<i>Micrococcus aurantiacus</i>	33
<i>Micrococcus flavus</i>	17
<i>Micrococcus candidus</i>	11
<i>Micrococcus sp.</i>	3

<i>Streptococcus sp.</i>	5
<i>Mima polymorpha</i>	22
<i>Herella vaginicola</i>	55
<i>Colloides anoxydana</i>	1
Organismos difteroides	1
<i>Candida krusei</i>	2

Sólo 29 de las 73 pacientes (39.5 %) presentaron *T. vaginalis* en su orina, lo que revela el poco valor diagnóstico de dicho examen para este fin.

En relación a las amenazas de aborto y aborto que se ha atribuído a este organismo, hemos controlado en la mayoría de las gestantes el curso del embarazo hasta el parto.

De 79 pacientes controladas (incluyendo infección mixta por *T. vaginalis* y *C. albicans*) 7 presentaron amenaza de aborto, de las cuales abortaron solamente dos, sin que se pudiera excluir otras causas del mismo.

b) INFECCION POR *CANDIDA ALBICANS*:

La mujer embarazada, con su mayor contenido de glucógeno vaginal, se hace susceptible a la infección por blastosporados.

Se encontró un total de 24 pacientes (8 %) parasitadas por *Candida albicans* (Tabla II). En otro grupo se mencionan 16 pacientes con *T. vaginalis* y *C. albicans* en infección mixta (Tabla II).

De las 24 pacientes, 18 presentaron inflamación vaginal, acompañándose de flujo viscoso, generalmente amarillo y en poca cantidad, prurito vulvar y enrojecimiento de la mucosa.

Las 6 restantes no presentaron inflamación pero sí sufrían de un prurito vulvar intenso, enrojecimiento de la mucosa y flujo viscoso.

El pH encontrado en las infecciones por *C. albicans* fluctúa entre 4 y 7, predominando el pH 4, que es considerado como normal, pero debido a que estos organismos prefieren medios ácidos y abundantes en glucógeno, cualidades que les brinda el embarazo, encontramos en la mitad de los casos un pH 4 y glucógeno abundante, acompañándose además en 4 de ellas de lactobacilos de Döderlein. (Tabla III). El pH encontrado en las 12 restantes se distribuyó entre 4.5 y 7 con un contenido de glucógeno menor. (Tabla III).

La mayoría de las infecciones por este organismo fueron encontradas después del quinto mes de embarazo.

Se aislaron además los siguientes microorganismos aerobios, la mayoría de ellos correspondiendo a un pH superior a 4.5:

<i>Micrococcus epidermidis</i>	31
<i>Micrococcus aurantiacus</i>	5
<i>Micrococcus flavus</i>	8
<i>Micrococcus sp.</i>	2
<i>Mima polymorpha</i>	6
<i>Herella vaginicola</i>	10
<i>Colloides anoxydana</i>	3

espermatozoos en todas las cinco, con lo que existe la posibilidad de que sea un tipo de vaginitis mecánica y transitoria causada por traumatismo durante el coito.

Los otros organismos bacterianos encontrados fueron:

<i>Micrococcus epidermidis</i>	1
<i>Herella vaginicola</i>	5

Presentan un flujo escaso, enrojecimiento de la mucosa y una de ellas manifiesta tener prurito vulvar.

B) Compuesto también de 5 pacientes que presentan inflamación vaginal, acompañada de flujo amarillo y abundante en cuatro y blanco y escaso en la restante. Solamente una presenta prurito vulvar y enrojecimiento de la mucosa.

Tres de ellas padecen de prolapso de la matriz y dos de várices vaginales, causas que posiblemente originan la vaginitis.

Los organismos aislados en este grupo de pacientes fueron algunos *Micrococcus* considerados como saprofíticos y organismos de la tribu *Mimeæ*. El pH es normal en todas ellas lo mismo que la cantidad de glucógeno.

C) Grupo compuesto por las 22 pacientes restantes, que presentan vaginitis acompañada de flujo abundante o en poca cantidad, manifestándose prurito vulvar y enrojecimiento de la mucosa.

El pH es normal con excepción de dos cuyo pH es 4.5. El contenido de glucógeno es abundante. Los organismos bacterianos no difieren de los de los otros grupos, predominando entre ellos *M. epidermidis* y *Herella vaginicola*. En dos de ellas se aísla *M. aurantiacus*, y se observa lactobacilos de Döderlein en ocho.

La cantidad de leucocitos es escasa y la orina es normal en todas ellas.

Existe la posibilidad de que este grupo presente un tipo de vaginitis denominado no infeccioso, o sea causado por alguna anomalía funcional no relacionada a parásitos, o bien, en algunas de ellas, por acción de sustancias químicas usadas como medicamentos o antisépticos.

TABLA I

CLASIFICACION DE PACIENTES

Grupo	Número de casos	%
Normales	94	31.33
Infecciones leves	60	20.0
Infecciones graves	114	38.0
Vaginitis no determinadas	32	10.66

TABLA II

CLASIFICACION DE INFECCIONES GRAVES ASOCIADAS
O NO A VAGINITIS

Agente o Agentes	VAGINITIS		NO VAGINITIS		TOTAL	
	N. casos	%	N. casos	%	N. casos	%
<i>T. vaginalis</i>	69	23	4	1.33	73	24.3
<i>C. albicans</i>	24	8	0	0	24	8
<i>C. albicans</i> y <i>T. vaginalis</i>	16	5.33	0	0	16	5.33
<i>E. coli</i>	1	0.33	0	0	1	0.33

TABLA III

RELACION DEL pH CON LOS ORGANISMOS ENCONTRADOS

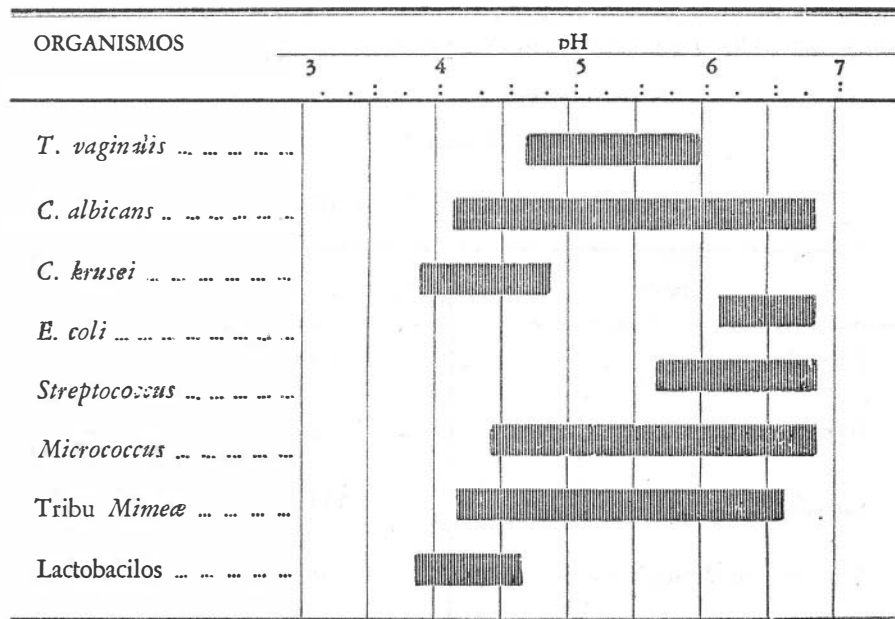


TABLA IV
TOTAL DE ORGANISMOS ENCONTRADOS (a)

ORGANISMOS	NUMERO CASOS	%
<i>T. vaginalis</i>	89	29.66
<i>Candida albicans</i>	40	13.33
<i>Candida krusei</i>	6	2.0
<i>Micrococcus epidermidis</i>	129	43.0
<i>Micrococcus aurantiacus</i>	69	23.0
<i>Micrococcus flavus</i>	54	18.0
<i>Micrococcus candidus</i>	24	8.0
<i>Micrococcus sp.</i>	15	5.0
<i>Gaffkia tetragena</i>	1	0.33
<i>Sarcina lutea</i>	2	0.66
<i>Streptococcus sp.</i>	7	2.33
Lactobacilos de Döderlein (b)	128	42.66
Difteroides (b)	2	0.66
<i>Escherichia coli</i>	1	0.33
<i>Mima Polymorpha</i> (c)	55	18.33
<i>Herella vaginicola</i>	131	43.66
<i>Colloides anoxydana</i>	8	2.66

- a) Según se describe en material y método.
- b) Clasificación por morfología al examen directo.
- c) No se efectuó diferenciación para *Mima polymorpha var. oxidans*.

CONCLUSIONES

Queda demostrado, al menos durante el embarazo, la importancia de infecciones de tipo no gonorréico, tales como aquellas causadas por *T. vaginalis*, *C. albicans* y *Escherichia coli*.

A pesar de encontrar cuatro pacientes aparentemente normales con *T. vaginalis*, insistimos en la patogenicidad de este protozoario, dados los ensayos realizados por algunos investigadores y la curación cuando se elimina el parásito. Su presencia en dichas pacientes puede ser el estado inicial de infección.

La infección por *C. albicans* está frecuentemente acompañada de infección por *T. vaginalis*, encontrándose síntomas más marcados en este grupo de pacientes. No se encontró ninguna cepa de *Candida stellatoidea*, tan frecuentemente citada en la literatura como saprofítica de la vagina humana.

Algunos organismos del género *Micrococcus* son capaces de crecer a un pH de 4, encontrándoseles acompañados de lactobacilos de Döderlein. Concordamos con la posibilidad de darle papel patógeno a algunas cepas de *Micrococcus aurantiacus*, organismo encontrado frecuentemente en disturbios vaginales leves y como acompañante de otras infecciones.

Las frecuentes formas bacilares y coco-bacilares Gram negativas observadas a examen microscópico de la muestra con esa coloración, se demuestra que per-

tencen a la tribu *Mimeæ*. Estos organismos, poco estudiados en nuestro medio, son encontrados tanto en vaginas normales como en vaginitis.

Estamos de acuerdo en la posibilidad de que algunas cepas de la tribu *Mimeæ* sean patógenas.

La tribu *Mimeæ* puede confundirse con *Neisseria*, dada la forma coco-bacilar Gram negativa de sus representantes, su presencia intracelular y por la propiedad de *Mima polymorpha* var. *oxidans* de dar reacción positiva con dimetil-p-fenil diamina.

Hemos aislado como organismos normales y saprofitos en las infecciones vaginales humanas *Candida krusei*, *M. epidermidis*, *M. aurantiacus*, *M. flavus*, *M. candidus*, *Gaffkya tetragena*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus* sp., *Mima polymorpha*, *Herella vaginicola*, *Colloides anoxydانا* y difteroides. (Tabla IV).

RESUMEN

A fin de determinar la importancia de infecciones vaginales de tipo no gonorréico en nuestra embarazada, se tomaron muestras a 300 pacientes y se efectuaron las siguientes pruebas de rutina a cada una de ellas: presencia de *Trichomonas vaginalis* por examen del material a fresco, flora bacteriana por platings sobre medio base para agar sangre, siembra y aislamiento de organismos del género *Candida* con posterior identificación específica utilizando los métodos del auxanograma y zimograma, determinación del pH por medio del indicador de Bogen, contenido de glucógeno de la mucosa utilizando lugol a fresco y examen microscópico de la muestra utilizando la coloración de Gram.

Las pacientes fueron divididas en los siguientes grupos: normales; con infecciones leves sin vaginitis; con infecciones graves acompañándose de vaginitis, incluyendo en este grupo infecciones por *T. vaginalis*, *C. albicans* y *Escherichia coli*. Un último grupo comprendió las que presentaban vaginitis no determinadas y de tipo no infeccioso, entre las que se cuentan algunas por causas traumáticas y otras posiblemente por disturbios funcionales.

Se encontró un total de 89 pacientes (29.66 %) con *Trichomonas vaginalis*, en 16 de las cuales éstas se acompañaron de *Candida albicans* y en 4 de las cuales las infecciones no se relacionaron a vaginitis ni anomalías, suponiéndose se trate de estados iniciales de infección.

Cuarenta pacientes (13.33 %) presentaron *Candida albicans*, 16 de las cuales tenían también *T. vaginalis*.

Una paciente mostró vaginitis causada por *Escherichia coli*.

Las pacientes presentaron *Candida krusei* en el 2 % de los casos, pero no se encontró ninguna cepa de *Candida steatoidea*.

Se determinó como flora bacteriana normal y saprofítica a *M. epidermidis*, *M. aurantiacus*, *M. flavus*, *M. candidus*, *Micrococcus* sp., *Gaffkya tetragena*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus* sp., *Mima polymorpha*, *Herella vaginicola*, *Colloides anoxydانا*, lactobacilos de Döderlein y difteroides.

RECONOCIMIENTO:

Mi agradecimiento al Prof. Alvaro Leiva Quirós, por sus cortesías y atenciones, lo mismo que al personal de Consulta Externa Prenatal del Instituto Materno Infantil Carit, por su colaboración en la toma de muestras y búsqueda de tarjetas clínicas y al Director de dicha Institución Doctor Máximo Terán V.

BIBLIOGRAFIA

1. BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. and PARKER HITCHENS, S.,
1948, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, sixth edition, The Williams & Wilkins Company, XV + 1529 pp.
2. DE BORD, G. G.
1942, Descriptions of *Mimeæ* trib. nov. with three Genera and three Species and two species of *Neisseria* from Conjunctivitis and Vaginitis, *Iowa State College Jour. Sci.*, 16 (4):471-480.
3. Difco Laboratories,
1948, *Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents*, Detroit, 1, Michigan, 224 pp.
4. KILDUFFS, R. A.,
1947, *Clinical Urinalysis and its Interpretations*, F. A. Davis Company, Philadelphia, vii + 428 pp.
5. LEWIS, R. M., & WEINSTEIN, L.
1936, The production of vaginal acidity by Estrin, *Surg. Gynec. Obst.*, 63 (5): 640-643.
6. LODDER, J.,
1934 Die anaskosporogenen Hefen. Erste Hafte. Verhandel Akad Wetenschappen Amsterdam, Afdeel Natuurkunde (2 ser.), 32:1-256. Citado por SKINNER, C. E.
1947, The Yeast-like Fungi: *Candida* and *Bretanomyces*, *Bact. Rev.* 11 (4): 227-274.
7. Medical Department of G. D. Searle & Co.,
1944, Vaginitis, its etiology, histology and treatment, *Research in the service of Medicine*, 5 (1): 1-24.
8. PICADO T., C.,
1942, El Agua de Coco como Medio de Cultivo,
Bol. Of. Sanit Panamer., 21 (10): 960-965.