



Determination of ABO/Rh blood group, sex and age with severity of *Helicobacter pylori* infection in Iranian gastrointestinal patients

Somayeh Reisi¹, Heshmat Shahi², Sara Shahi³, Mohammad Sadegh Damavandi⁴

1. Department of Genetic, Faculty of Basic Science, Shahrokoed University, Shahrekord, Iran
2. Department of Immunology, Faculty of Medicine, AJA Medical University, Tehran, Iran
3. Department of Nursing, Nurse and Midwifery Faculty, Astara Branch Islamic Azad University, Astara, Iran
4. Department of Immunology and Microbiology, Faculty of Medicine, Shahrekord Medical University, Shahrekord, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/04/27

Accepted: 2017/05/09

Available online: 2017/06/07

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(2): 81-86

Corresponding author:

Heshmat Shahi

Department of Immunology,
Faculty of Medicine, AJA
Medical University, Tehran,
Iran

Tel: 0989365947672

Email:

Heshmat.shahi@gmail.com

Abstract

Background and Aims: *Helicobacter pylori* infection currently become as an endemic worldwide health issue. The infection causes variety of gastrointestinal diseases. The role of blood groups is established in body's response to microorganisms and the development of gastrointestinal disorders. This study aimed to investigate the relationship between blood groups, age and gender of Iranian population and the severity of infection with this bacteria.

Materials and Methods: The study included 160 patients with dyspepsia symptoms referred to Hajar hospital in Shahrekord. Biopsy specimens were investigated in terms of being infected with *H. pylori* by using PCR for *16SRNA* gene and *glmM* gene and blood groups of patients were determined by using hemagglutination routine test.

Results and Conclusions: It was observed that 61.87% of patients were positive in terms of bacteria existence and 61 of them were negative. 62.26% of infected patients with bacteria were female. The highest frequency of ABO blood groups among infected patients, belongs to O blood group with 40.66 percent ($P > 0.05$). *H. pylori* was found in 77.12% of Rh+ patients ($P < 0.05$). There is not significant relation between sex and age with infection ($p > 0.05$). The severity of this bacterial disease were observed in patients with blood group O more than others ($P < 0.05$). Rh positive in infected patients and O blood group may cause to severity of *H. pylori* infection.

KeyWords: *Helicobacter pylori*, ABO blood group, Rhesus factor, PCR

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Reisi S, Shahi H, Shahi S, Damavandi MS. Determination of ABO/Rh blood group, sex and age with severity of *Helicobacter pylori* infection in Iranian gastrointestinal patients. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (2): 81-86



Farname Inc.

بررسی گروه‌های خونی ABO/Rh، سن و جنس با شدت آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلابه ناراحتی‌های گوارشی

سمیه رئیسی^۱، حشمت شاهی^۲، سارا شاهی^۳، محمدصادق دماوندی^۴

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
۳. گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آستارا، آستارا، ایران
۴. گروه ایمنولوژی و باکتریولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: عفونت هلیکوباکتر پیلوری در حال حاضر به صورت یک مسئله بهداشتی جهانگستر تبدیل شده است. این عفونت می‌تواند باعث بیماری‌های مختلف گوارشی شود. نقش گروه‌های خونی در نحوه پاسخگویی بدن به میکروارگانیسم‌ها و گسترش اختلالات دستگاه گوارش تثبیت شده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین گروه‌های خونی و سن و جنس در جمعیت ایرانی با شدت آلودگی به این باکتری است.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۱۶۰ بیمار دارای ناراحتی‌های گوارشی که به بیمارستان هاجر مراجعه کرده بودند وارد مطالعه شدند. نمونه‌های بیوپسی بیماران از لحاظ آلوده بودن به هلیکوباکتر پیلوری با روش PCR برای ژن‌های *glmM* و *16SRNA* بررسی شدند و تعیین گروه‌های خونی بیماران نیز با تست روتین هم‌آگلوتیناسیون صورت گرفت.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: مشاهده شد که ۱۱/۸۷٪ از بیماران از لحاظ وجود باکتری مثبت بودند و ۶۱ نفر از بیماران منفی بودند. در میان بیماران آلوده به باکتری ۶۲/۲۶٪ زن بودند. بیشترین فراوانی گروه‌های خونی ABO در میان بیماران آلوده برای گروه خونی O با ۴۰/۶۶٪ بود ($p > 0.05$). ۷۷/۸۲٪ از افراد Rh مثبت نیز آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بودند ($P < 0.05$). ارتباط معنی‌داری بین سن و جنس با میزان آلودگی مشاهده نشد. شدت آلودگی به این باکتری نیز در بیماران دارای گروه خونی O+ بیشتر از بقیه مشاهده شد ($P < 0.05$). مثبت بودن Rh در بیماران آلوده و گروه خونی O ممکن است در تشدید آلودگی به این باکتری نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، گروه خونی ABO، فاکتور رزوس، PCR

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۸

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(2): 81-86

نویسنده مسئول:

حشمت شاهی

گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۳۶۵۹۴۷۶۷۲

پست الکترونیک:

Heshmat.shahi@gmail.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

آندوکارسینومای معده دارد (۳). در بررسی‌های مختلفی مشخص شده است که گروه‌های خونی با انواع بیماری‌ها می‌تواند در ارتباط باشند مثلاً گروه خونی O ارتباط نزدیکی با زخم دوازدهه و گروه خونی A ارتباط نزدیکی با کارسینوم معده دارد، درحالی‌که علت دقیق آن مشخص نیست (۴،۵). تست‌های مختلفی وجود دارد که با آن‌ها می‌توان وجود این باکتری را تشخیص داد که در این بین می‌توان به روش‌های آندوسکوپی و

شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای در حال توسعه نزدیک به ۸۰٪ و در کشورهای توسعه‌یافته چیزی در حدود ۵۰-۲۰٪ است. مقدار شیوع این عفونت نیز در کشور ما در حدود ۷۰-۵۰ درصد است (۱،۲). مطالعات اپیدمیولوژیک متفاوتی انجام گرفته که نشان می‌دهد شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری در رده‌های سنی گوناگون، مختلف است. عفونت ناشی از این باکتری رابطه نزدیکی با گاستریت، زخم معده و حتی

برداشت بیوپسی از بافت معده، آنتی‌بادی علیه باکتری و حتی تست تنفسی اوره آز اشاره کرد (۶). هدف از این مطالعه بررسی ارتباط شدت آلودگی به این باکتری با انواع گروه‌های خونی ABO/Rh و سن و جنس در بیماران ایرانی است که از اختلالات و ناراحتی‌های دستگاه گوارشی شاکی هستند.

مواد و روش‌ها

این بررسی به صورت مقطعی تحلیلی بوده که شامل ۱۶۰ بیمار می‌باشد که طی ۹ ماه در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۲ با علائم ناراحتی‌های گوارشی به مرکز آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه کردند. بیماران افرادی بودند که طی یک ماه گذشته هیچ نوع داروهای آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اسید مصرف نکرده‌اند و بالای ۱۸ سال سن داشتند. بر اساس ناراحتی‌های گوارشی، توسط پزشک متخصص بعد از تکمیل فرم رضایت‌نامه، از بیماران نمونه بیوپسی و خون تهیه شد. بیمارانی که قبلاً عمل جراحی معده داشتند و یا تحت درمان ریشه‌کنی هلیکوباکتر پیلوری بوده‌اند، از مطالعه خارج شدند. از هر بیمار ۲ نمونه بیوپسی جهت انجام تست‌های اوره آز سریع (RUT)، PCR و رنگ‌آمیزی نقره و ۵ میلی‌لیتر خون وریدی جهت تعیین گروه‌های خونی ABO و Rh گرفته شد. بررسی نتایج تست اوره آز (با حساسیت ۹۵ درصدی) به این صورت بود که بعد از اینکه بیوپسی بافتی با نوار کیت مجاور می‌شد، تغییر رنگ می‌داد که نشانه مثبت شدن وجود باکتری می‌بود. برای تعیین گروه‌های خونی بیماران از تست‌های روتین هم‌آگلوتیناسیون به صورت اسلایدی استفاده شد. برای استخراج DNA نیز از کیت استخراج DNA شرکت Bioflex ژاپن استفاده شد که بر اساس دستورالعمل موجود در کیت، استخراج صورت گرفت و واکنش PCR برای شناسایی وجود دو ژن *16SRNA* و *glmM* بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. برای تأیید وجود باکتری با حساسیت ۹۹ درصدی در نمونه‌ها وجود دو ژن اختصاصی و خانه نگهدار به نام‌های، ژن *glmM* که ژن کد کننده فاکتور *ureC* می‌باشد و از ژن‌های اختصاصی و محافظت‌شده در باکتری می‌باشد (با توالی پرایمری Forward: 5'/AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' و Reverse: 5'/GCATTCACAACTTATCCCCAATC-3' و

ژن *16SRNA* نیز ژن کد کننده جزئی *16S* ریبوزومی باکتری می‌باشد که پرایمر استفاده‌شده برایان (با توالی پرایمری Forward: 5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3' و Reverse: 5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3')، اختصاصی برای هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد، مدنظر بود (۶). برای تأیید محصولات PCR نیز از روش الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل آمید (PAGE) استفاده شد (شکل ۱). وجود باکتری در نمونه با مثبت شدن هر سه تست اوره آز سریع، PCR و رنگ‌آمیزی نقره تأیید شد. در نمونه‌های پاتولوژی نیز حضور و دانسیته باکتری با استفاده از رنگ‌آمیزی نقره و زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $400 \times$ و $1000 \times$ مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس سیستم سیدنی با درجه‌های Mild, Moderate, sever گزارش شد. نمونه استاندارد که در این مطالعه استفاده شد هلیکوباکتر پیلوری ATCC26695 بود.

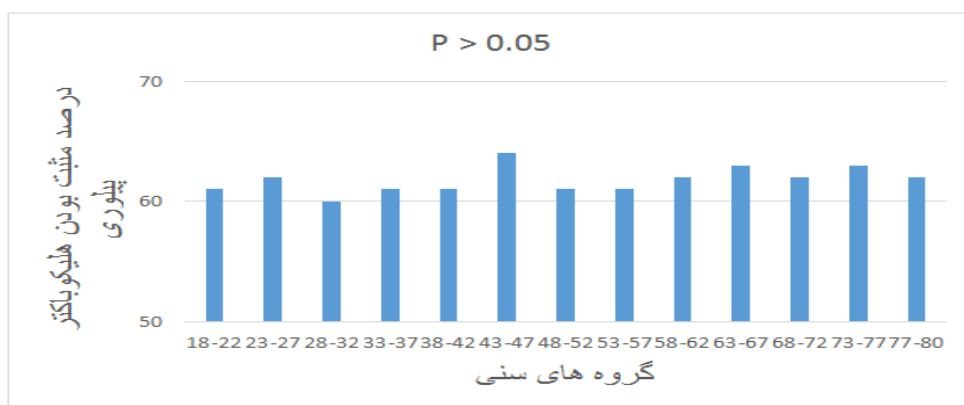
تجزیه تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات آماری نیز از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ زیر نظر متخصص آمار استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

در این مطالعه ۶۱/۸۷٪ از مراجعه‌کنندگان از لحاظ آلودگی به باکتری مثبت بودند. با توجه به شکل ۱ این مثبت بودن در گروه‌های سنی مختلف نشان داده شده است. میزان مثبت شدن در گروه‌های مختلف سنی نزدیک به هم بوده و ارتباط معنی‌داری بین گروه‌های سنی و میزان مثبت شدن آلودگی به باکتری وجود ندارد ($P > 0.05$).

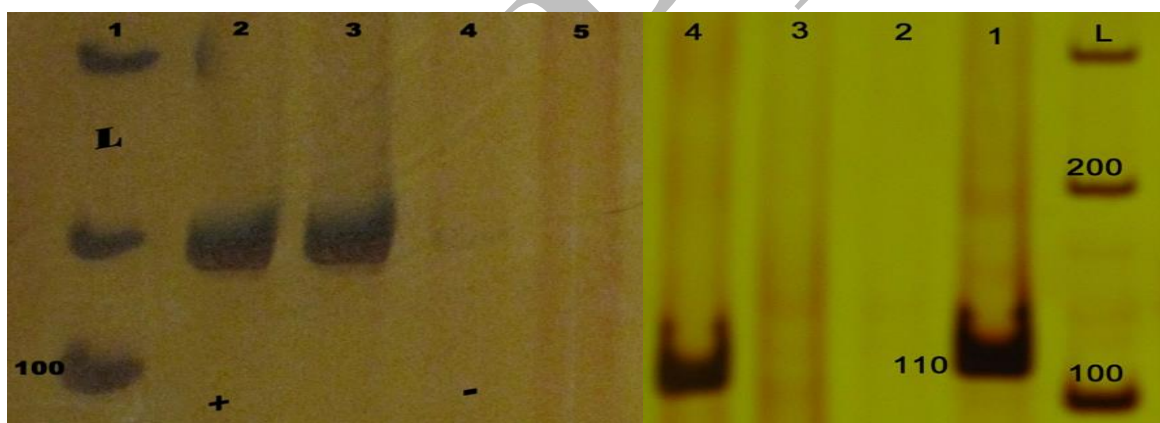
در بین بیمارانی که از نظر وجود باکتری مثبت بودند، ۳۷/۷۴٪ مرد و ۶۲/۲۶٪ زن بودند و در بین بیماران منفی از نظر آلوده بودن به باکتری ۵۰/۰۵٪ مرد و ۴۹/۹۵٪ زن بودند. در بررسی‌های گروه‌های خونی ABO/Rh در بین بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری ۳۳/۰۵٪ گروه خونی A، ۲۰/۲۳٪ گروه خونی B، ۶/۰۶٪ گروه خونی AB و ۴۰/۶۶٪ گروه خونی O را داشتند و در بین بیمارانی که به هلیکوباکتر پیلوری آلوده نبودند، ۳۲/۳۲٪ گروه خونی A، ۲۵/۵۱٪ گروه خونی B، ۸/۸۴٪ گروه خونی AB و ۳۳/۳۳٪ گروه خونی O را دارا بودند.



نمودار ۱: توزیع مثبت بودن آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در گروه های مختلف سنی

($P < 0.05$). هلیکوباکتر پیلوری از شایع ترین باکتری هایی است که می تواند بیماری های مزمن ایجاد کند و از مهم ترین عللی است که می تواند باعث ایجاد سرطان معده شود (۷). این باکتری راه های انتقال مختلفی مثل مدفوعی-دهانی و از شخص به شخص دارد و هنوز هیچ مطالعه ای ثابت نکرده که این باکتری از طریق دهان به دهان منتقل می شود (۸).

در بررسی های Rh نیز مشاهده شد که افرادی که آلوده به باکتری بودند ۷۰/۱۲٪ از لحاظ Rh مثبت بودند ($P < 0.05$). همچنین در بررسی هایی که بر روی شدت تراکم وجود باکتری از طریق رنگ آمیزی نقره در نمونه های بافتی صورت گرفت دیده شد که ۸۱/۸٪ از بیمارانی که گروه خونی O دارند، دارای بیشترین تراکم باکتریایی با درجه Sever در نمونه های بافتی خود هستند



شکل ۱: واکنش PCR انجام شده با پرایمر *I6SRNA* (سمت راست). ستون L: لدر ۱۰۰ bp، ستون ۱: کنترل مثبت هلیکوباکتر پیلوری (۱۱۰ bp)، ستون ۲: کنترل منفی، ستون ۳: نمونه منفی کلینیکی، ستون ۴: نمونه مثبت کلینیکی. واکنش PCR انجام شده با پرایمر اختصاصی *glmM* (سمت چپ). ستون ۱: لدر ۱۰۰ bp، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون ۳: نمونه مثبت کلینیکی، ستون ۴: کنترل منفی، ستون ۵: نمونه منفی کلینیکی

جدول ۱: بررسی توزیع گروه های خونی در بین بیماران آلوده و غیر آلوده به هلیکوباکتر پیلوری

گروه های خونی	هلیکوباکتر پیلوری + (%)	هلیکوباکتر پیلوری - (%)	P value
A	۳۳/۰۵	۳۲/۳۲	$0.05 <$
B	۲۰/۲۳	۲۵/۵۱	
AB	۶۱/۰۶	۸/۸۴	
O	۴۰/۶۶	۳۳/۳۳	
گروه های خونی Rh	هلیکوباکتر پیلوری + (%)	هلیکوباکتر پیلوری - (%)	P value
مثبت	۷۰/۱۲	۲۰/۴	$0.05 >$
منفی	۲۹/۸۸	۷۹/۶	

میزبان مرحله مهمی در ایجاد و گسترش بیماری است، این آنتی‌ژن‌ها می‌توانند به‌عنوان محل اتصال باکتری به سلول‌های بدن باشند (۱۶). Keller و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی ۳۳۰ بیمار انجام دادند، مشاهده کردند که هیچ رابطه معنی‌داری بین انواع گروه‌های خونی و شیوع آلودگی به این باکتری مشاهده نکردند که مطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر که در غرب آسیا بر روی ۱۰۳۰ بیمار انجام شد نیز همین نتیجه به دست آمد و ارتباط خاصی با گروه خونی و شدت تراکم باکتری یافت نشد (۱۸). در تعدادی از مطالعات نیز برخلاف مطالعه حاضر ارتباطات خاصی بین گروه خونی A و سرطان معده مشاهده شد (۱۹). در مجموع این مطالعه نشان داد که آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در بیمارانی که دارای نشانه‌هایی از اختلالات گوارشی بودند شایع بود و آلودگی در افرادی که Rh مثبت بودند نسبت به بیمارانی که منفی بودند، بیشتر بود و ارتباطی بین آلودگی به باکتری باسن و جنس دیده نشد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از تمام همکاران مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی و بخش اندوسکوپي بیمارستان هاجر شهرکرد کمال تشکر را دارم.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

شیوع این باکتری در نقاط مختلف جهان بسیار متفاوت است. علت زیاد بودن باکتری در گروه خونی O و Rh می‌تواند این نکته باشد که در این گروه خونی، آنتی‌ژن لوئیس بیشتری بیان می‌شود که همین آنتی‌ژن به‌عنوان رسپتوری برای ادهسین babA باکتری عمل می‌کند. در مطالعه‌ای که در کشور چک انجام شد شیوع این باکتری در افراد بین سن ۵ تا ۱۰۰ سال در حدود ۴۱/۷٪ بود و مشاهده شد که مشابه با نتایج مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین نوع جنسیت با آلودگی به باکتری دیده نشد (۹). مطالعه‌ای در کامرون نشان داد که شیوع این باکتری در حدود ۵۲/۲۷٪ بود و برخلاف نتیجه مطالعه حاضر باگذشت سن درصد آلودگی به باکتری بیشتر می‌شود (۱۰). مطالعه‌ای دیگر در برزیل نشان داد که درصد شیوع این باکتری در حدود ۶۳/۴٪ بود که نزدیک به درصد شیوع این باکتری در جمعیت ایرانی بود و مشابه با نتایج مطالعه حاضر باگذشت سن درصد آلودگی به باکتری افزایش نمی‌یابد (۱۱). در مطالعه‌ای که در کشور ترکیه انجام شد مشابه با نتایج این مطالعه حاضر با گذر سن درصد شیوع این باکتری افزایش نمی‌یابد و هیچ ارتباط معنی‌داری هم با جنسیت افراد ندارد (۱۲). تعدادی از مطالعات نیز شیوع آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری را در بین مردان بیشتر از زنان گزارش کردند و علت آن را کار در خارج از منزل مردان دانستند (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر نیز این غالب بودن میزان آلودگی تنها در مردان بالغ دیده شد (۱۴). از طرف دیگر مطالعات مختلفی هم بررسی شد که هیچ ارتباطی بین جنسیت و احتمال افزایش آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری را نشان ندادند (۱۵). گروه خونی، سیستمی از آنتی‌ژن‌های اریتروسیته‌ای است که در همه جمعیت‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند و مهم هستند. از آنجاکه اتصال باکتری به سلول‌های

References

- Shahi H, Reisi S, Sadeghiani M, Mahsa M, Bahreini R, Moghni M, et al. Prevalence of *cagA* and *babA2* genes in *Helicobacter Pylori* strains Isolated from Iranian gastrointestinal disorder patients and their gas-tritis classification. *J Biol Today's World* 2014;3(12):256-60.
- Shahi H, Reisi S, Bahreini R, Bagheri N, Salimzadeh L, Shirzad H. Association between *Helicobacter pylori cagA*, *babA2* Virulence Factors and Gastric Mucosal *Interleukin-33* mRNA Expression and Clinical Outcomes in Dyspeptic Patients. *IJMCM* 2015;4(4):227-34.
- Moghni M, Reisi S, Shahi H. Study of Association between *Helicobacter pylori* Infection and Microalbuminuria in Type-2 Diabetic Patients. *JPAM* 2015;9(4):3367-72.
- Smith A, Aathithan S, Power EM, Abdulla Y. Blood group antigens and *Helicobacter pylori* infections. *The Lancet* 1994;343(8896):543.
- Kuku İ, Kaya E, Erkurt MA, Dikilitaş M, Yıldız R, Orhan M, et al. Malatya ve çevresi ABO ve Rh kan grubu dağılımı. *IUTFD* 2004; 11(4) 213-215.
- Shahi H, Moghni M, Shirzad H. The relation between severe density of *Helicobacter pylori* in biopsy with cigarette smoking and age in infected patients. *IJMM* 2015;9(1):1-5.
- Mishra J, Ruggiero P, Bagnoli F, Rappuoli R, Stein M. *Helicobacter pylori*: The Cancer Bug. *Infection and Cancer: Bi-Dir Inter: Springer*; 2015. p. 171-211.

8. Luman W, Zhao Y, Ng HS, Ling KL. *Helicobacter pylori* infection is unlikely to be transmitted between partners: evidence from genotypic study in partners of infected patients. EUR J GASTROEN HEPAT 2002;14(5):521-8.
9. Bures J, Kopáčová M, Koupil I, Voríšek V, Rejchrt S. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in the Czech Republic. *Helicobacter* 2006;11(1):56-65
10. Ndip RN, Malange AE, Akoachere JF, MacKay WG. *Helicobacter pylori* antigens in the faeces of asymptomatic children in the Buea and Limbe health districts of Cameroon: a pilot study. Trop Med Int Health. 2004;9(9):1036-40.
11. Santos IS, Boccio J, Santos AS, Valle NC, Halal CS, Bachilli MC, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and associated factors among adults in Southern Brazil: a population-based cross-sectional study. BMC Public Health. 2005;5(1):1-10.
12. Abasiyanik MF, Tunc M, Salih BA. Enzyme immunoassay and immunoblotting analysis of *Helicobacter pylori* infection in Turkish asymptomatic subjects. Diagn Micr Infec Dis 2004;50(3):173-7.
13. Broutet N, Sarasqueta A-M, Sakarovitch C, Cantet F, Lethuaire D, Mégraud F. *Helicobacter pylori* infection in patients consulting gastroenterologists in France: prevalence is linked to gender and region of residence. Eur J Gastroen Hepat 2001;13(6):677-84.
14. Martel C, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* Infection and Gender: A Meta-Analysis of Population-Based Prevalence Surveys. Digest Dis Sci 2006; 51(12):2292-301.
15. Asrat D, Nilsson I, Mengistu Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among adult dyspeptic patients in Ethiopia. Ann Trop Med Parasitol. 2004;98(2):181-9.
16. shahi H, Moghni M, Bahreini R, Reisi S, Sadeghiani M, Rahimi M, et al. Association Between *H.pylori* babA Virulence Factor with Clinical Outcome and ABO Blood Groups. JPAM 2015;9:285-90.
17. Keller R, Dinkel KC, Christl SU, Fischbach W. Interrelation between ABH blood group O, Lewis (B) blood group antigen, *Helicobacter pylori* infection, and occurrence of peptic ulcer. Z Gastroentrol 2002;40:273-8.
18. Sharara A, Elhajj I, Kreidieh N, Kfoury B. Association of gastroduodenal disease phenotype with ABO blood group and *Helicobacter pylori* virulence-specific serotypes. Dig Liver Dis 2006;38:829-33.
19. Nakao M. ABO genotype and the risk of gastric cancer, atrophic gastritis, and *Helicobacter pylori* infection. Cancer Epidem Biomar 2011;20(8):1665-72.

Final Proof

