

293
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACION
PASIVA E INMUNODIFUSION PARA EL DIAGNOSTICO
DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA.

T E S I S
Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p r e s e n t a
JULIAN ERNESTO SERRANO VIZUET



Asesores: M.V.Z. Angel Retana Reyes
M.V.Z. Rebeca Pérez Becerra

MEXICO, D. F. 1991

RECEBIDA EN LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	6
OBJETIVO	6
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	14
CUADROS	17
GRAFICA	19
DISCUSION	21
LITERATURA CITADA	23

RESUMEN

Serrano Visuet Julián Ernesto. Diagnóstico de Bronquitis Infecciosa mediante las pruebas de Hemoaglutinación pasiva e Inmunodifusión. (Bajo la dirección de Angel Retana Reyes).

El presente trabajo se realizó con el objeto de contar con alternativas para la realización del diagnóstico de Bronquitis Infecciosa en las aves domésticas, teniendo como finalidad determinar el valor del diagnóstico de la Hemoaglutinación pasiva e Inmunodifusión correlacionado con los hallazgos del aislamiento viral de la Bronquitis Infecciosa.

Se trabajaron 40 aves sospechosas a Bronquitis Infecciosa tomando muestras de traquea, pulmon y riñones, los cuales se maceraron y centrifugaron e inmediatamente se corrieron las tres pruebas que son Hemoaglutinación pasiva, Inmunodifusión corroborándolas con la de Aislamiento viral.

Mediante la fórmula de Bayes se obtuvo una especificidad del 85% y una sensibilidad del 100% para la prueba de Hemoaglutinación pasiva, en cuanto a la prueba de Inmunodifusión se obtuvo una especificidad de un 70% y sensibilidad del 100%. Corroborandose así ambas pruebas con el Aislamiento viral.

La prueba de Hemoaglutinación pasiva, resultó ser eficiente para el diagnóstico de Bronquitis Infecciosa por ser confiable, rápida fácil de realizar y económica; complementando esta prueba con la prueba de Aislamiento viral es de gran apoyo para el diagnóstico de Bronquitis Infecciosa.

INTRODUCCION

La Bronquitis infecciosa es una enfermedad viral altamente contagiosa de curso agudo que afecta el aparato respiratorio o al aparato genito-urinario, dependiendo de la cepa del virus (10,15,16,18).

Entre las cepas que afectan principalmente el aparato respiratorio de las gallinas domésticas, se encuentran: Massachusetts 41, Connecticut, Iowa 97, Arkansas 99 y las que afectan al aparato genito-urinario son: Holte, Gray y "T" Australiana (10,15,16,18).

Esta enfermedad es de importancia vital, cuando se presenta produce pérdidas económicas, debido a una disminución en la producción de huevo, deterioro de la calidad interna y externa del huevo, reduce la eficiencia alimenticia, incrementa el número de aves de desecho por improductivas, predispone a otras enfermedades respiratorias y en animales jóvenes produce retraso en el crecimiento y una mortalidad del 5% al 30% (15).

La transmisión se efectúa a través de aerosoles contaminados con secreciones nasales y heces de aves infectadas, la eliminación del virus puede durar cuatro semanas después de la infección o un período mayor (10).

El agente causal es un coronavirus de la familia Coronaviridae. El virus se distingue por poseer uno de los genomas más grandes de ARN de una sola molécula portadora de una secuencia poli-A vinculada en forma covalente a la

terminal 3', habiéndose encontrado unos 16 polipéptidos, incluyendo cuatro importantes. Su densidad es de 1.16 a 1.27 g/ml (4,16,18).

Algunas cepas hemoaglutinan los glóbulos rojos de ave, después de un tratamiento con fosfolipasas C (Massachusetts) o tripsina a temperatura ambiente (Conecticut), Cowen y Hitchner describen 8 grupos serológicos demostrables por virus suero neutralización (VSN) y 4 por reducción de placa con numerosos intergrupos relacionados en ambos casos (16,18).

Para el diagnóstico de laboratorio, uno de los métodos más utilizados es el aislamiento viral en embrión de pollo de 9 a 11 días de edad por vía alantoidea, a partir de las muestras de tráquea, pulmón y riñón mediante la adaptación del virus de campo al embrión de pollo, utilizando pases seriados cada 48 horas. Es necesario efectuar hasta 7 pases para detectar el virus en el embrión de pollo, por lo que el diagnóstico se hace largo y costoso (1,2,10,15,16).

Virus Suero Neutralización. Es una prueba cuantitativa que detecta niveles de anticuerpos circulantes o antígenos de Bronquitis Infecciosa. Aunque el método alfa y beta de la prueba de neutralización de virus (VN) son específicas y no proporcionan directamente los resultados afines. En términos generales, se usa el método alfa para identificar un antígeno con los antiseros específicos contra el virus en prueba. El método beta identifica los títulos de anticuerpos

circulantes por lo que pueden ser anticuerpos vacunales o anticuerpos del virus de campo (16).

Inmunoensayo enzimático (ELISA) es una prueba cuantitativa similar en aplicación a la prueba de virus suero neutralización (VSN). Es altamente sensible pero poco específico y además requiere de reactivos y equipo costoso de importación (19).

Hemoaglutinación pasiva, es una prueba semicuantitativa que ha servido como diagnóstico útil de las enfermedades y como método de investigación, identificación y caracterización de los virus, se encuentra entre las técnicas serológicas más sensibles que se conocen. Como se sabe no todos los virus poseen la capacidad de producir la hemoaglutinación, pero en algunos casos éste proceso se llega a inducir modificando las propiedades químicas, ya sea en la superficie del eritrocito o por el tratamiento enzimático del virus (1,6,7,8,9,12,13).

Inmunodifusión. Este método es fácil de interpretar por que permite identificar las bandas de precipitación, mediante el empleo simultáneo en el mismo esquema de reacción de los diferentes serotipos del virus de la B.I. y los anticuerpos conocidos, ya que se difunden libremente en gel, y dan lugar a precipitados o equivalencias (3,5,8,9,11,12,13).

Actualmente en nuestro país el diagnóstico de la B.I. se basa principalmente en el aislamiento viral, pero como se menciona anteriormente, se requiere de más tiempo, por lo

que las pruebas de hemoaglutinación pasiva e inmunodifusión pueden corroborar en el diagnóstico de éstas enfermedades.

Segmentando redes de área local grandes en redes pequeñas para mantener un tráfico local "local".

Permitiendo gran flexibilidad de elegir servicios de WAN, administrando el ancho de banda de TI, y configuración.

Permitiendo por expansión, emigración, y flexibilidad en comunicaciones basadas en LAN.

HIPOTESIS.

La hemoaglutinación pasiva e inmunodifusión proporcionan resultados semejantes a los del aislamiento viral de B.I..

OBJETIVO.

Evaluar las pruebas de hemoaglutinación pasiva e inmunodifusión con el aislamiento viral de B.I..

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizarón 40 muestras de tráquea y pulmón de casos sospechosos de Bronquitis Infecciosa, las cuales se maceraron y centrifugaron, con las cuales se corrieron las pruebas de hemoaglutinación pasiva e inmunodifusión y el resto de cada una de las muestras fueron corroboradas con la inoculación a embrión de pollo de 9 a 10 días de edad para el aislamiento viral de B.I., y se utilizaron de 6 a 10 pases (2).

Las muestras positivas fueron obtenidas de pollos de tres semanas de edad, inoculados con virus de B.I., cepa Massachusetts y se tomaron muestras de pollos libres de la enfermedad como muestras negativas.

PROCESO DE PREPARACION DE ANTISUEROS CONTRA B.I.

Esquema de sensibilización en pollos: Los pollos fuéron inoculados intramuscular e intratraquealmente, dos veces a la semana, durante seis semanas con 1 ml de la cepa Massachusetts, una semana después de la última inoculación fuéron desangrados. Los antisueros se inactivaron a 56°C por 30 minutos y conservados en congelación a 20°C.

Esquema de sensibilización en conejos: Los conejos fuéron inoculados con virus de B.I. intraperitonealmente cuatro veces con un intervalo de una semana con 3 ml en las

dos primeras inoculaciones 4 ml en la tercera y 5 ml en la cuarta semana. Posteriormente, se dejaron descansar tres semanas y al cabo de estas se inocularon por la misma via una dosis de reforzamiento de 5 ml. Los conejos fueron desangrados diez dias despues de la ultima inoculacion y los antisueros fueron inactivados y congelados de la misma forma que se realizo con los antisueros de los pollos.

TECNICA DE HEMOAGLUTINACION PASIVA

Materiales y equipo:

Eritrocitos de carnero.

Solucion de Alsever.

Glutaraldehido.

Acido Tanico.

Solucion Salina Buffer (PBS) pH 7.2 y 6.4.

Solucion de anticuerpo (Suero de ave y conejo).

Equipo de microaglutinacion.

Método:

A.- 6 ml de suero de ave o conejo se precipitaron 6 ml de sulfato de amonio gota a gota durante 1:30 horas y se centrifugo a 2500 rpm durante 15 minutos. Y resuspender con 6 ml de Solucion Salina Fisiologica (SSF).

B.- Se dializo durante 24 horas cambiando (SSF) cada 8 horas.

C.- Las Inmunoglobulinas fueron adsorbidas con eritrocitos de carnero y se dejó reposar a una temperatura ambiente por 30 minutos. En seguida, el complemento fue inactivado a 56 ° C por 30 minutos.

Suspensión de Glóbulos Rojos.-

La sangre de carnero fue obtenida por punsion en la vena yugular en condiciones asépticas y recibida directamente en un matr az que contenía solución de Alsever's modificada. Para un volumen de sangre de carnero (100 ml); se empleó un volúmen de la solución de Alserver's (100 ml). Se le deja reposar durante 24 horas a temperatura de refrigeración. Los eritrocitos se lavan con solución salina buffer pH 7.2, por tres veces consecutivas.

Tanizaci n de Glóbulos Rojos.-

Se pone 1 ml del paquete de eritrocitos en 39 ml de PBS pH 7.2 para obtener una suspensión de 2.5 %.

Añadir un volumen igual (40 ml) de solución de ácido t nico 1:20,000; mezclar e incubar en baño María a 37 °C por 10 minutos. Sacar los eritrocitos del baño María y centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm. Descartar el sobrenadante, lavar con PBS pH 7.2 y centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos y resuspender los eritrocitos en PBS pH 6.4 para hacer una suspensión al 2.5 %.

Fijación de Globulos Rojos con Glutaraldehído al 1 %.-

A un volúmen de 3 ml de la suspensión de eritrocitos se añaden 25 ml de glutaraldehído al 1 %.

Adsorción de antígeno a los eritrocitos teñidos y fijados.-

Para sensibilizar los hematíes teñidos y fijados, un volúmen de éstos se mezclan con un volúmen igual de la solución de Inmunoglobulinas de ave o conejo, en PBS pH 6.4. Se agita y se les coloca en baño termostático a 37 °C por 30 minutos. Después de este período de incubación, los eritrocitos son lavados con PBS pH 7.2 y centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se resuspende en 5 ml de PBS pH 7.2.

Los glóbulos rojos así preparados, se guardan en refrigeración y quedan listos para usarse en la prueba de hemoaglutinación.

Prueba de Hemoaglutinación Pasiva en Microplaca.

A cada pozo de la placa de aglutinación se le añade una gota (0.05 ml) de PBS pH 7.2 con suero de ave (SSF) al 1%. Se deposita una gota (0.05 ml) de la suspensión problema diluido; 1:2 en la primera hilerá vertical, quedando una dilución 1:4. Con los agitadores se hacen las posteriores diluciones hasta 1:4096. Luego a cada pocito se le agrega la solución de eritrocitos de carnero ya procesados, por último, se agita la placa hasta obtener una suspensión

homogénea de los eritrocitos, se colocan en el refrigerador durante 24 horas y se realiza posteriormente la lectura de resultados.

TECNICA DE INMUNODIFUSION.

Técnica de Doble Inmunodifusión.

Material y equipo.

Tampón de antígeno (suspensión problema)

Soluciones de suero (suero de ave y conejo)

Perforadora de geles.

Método para realizar el agar.

0.2 gr Tris

0.85 gr de Cloruro de Sodio.

a 1 gr de agar noble especial.

100 ml de agua bidestilada.

1:10,000 de (Thimerosol).

pH 8.6

Método

1. Fundir el agar en un baño de agua hirviendo.
2. Depositar el agar sobre cajas de Petri.
3. Perforar con el modelo de perforadora deseado.
4. Aspirar el molde de agar con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.

5. Llenar los posillos con las muestras problema y en el centro llenar el pocillo con las Inmunoglobulinas de ave o conejo.

6. Colocar la caja de Petri en una cámara húmeda e incubar toda la noche a temperatura ambiente (26.6-27°C).

Interpretación de los Resultados.

La línea de identidad tiene lugar entre determinantes antigénicos idénticos. Las líneas de precipitación se fusionan para dar un arco continuo.

AISLAMIENTO VIRAL.

Para el diagnóstico de Bronquitis Infecciosa se realizó el aislamiento viral en embrión de pollo de 9 a 11 días de edad siguiendo la técnica de González O. (2).

METODO ESTADISTICO.

Se tomarón 40 muestras sugestivas a Bronquitis Infecciosa, obtenidas de las pruebas de hemoaglutinación pasiva e inmunodifusión, se les aplicó el análisis estadístico desarrollado por Bayes (14), para determinar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas en comparación con el aislamiento viral, según las siguientes fórmulas.

SENSIBILIDAD = $P(T/E) = TP/TP + FN$

ESPECIFICIDAD = $P(T/E) = TN/FP + TN$ DONDE:

$P(T/E)$ Es la probabilidad de que ocurra un evento en una prueba positiva (sensibilidad).

$P(T/E)$ Es la probabilidad de que no ocurra un evento en una prueba negativa (especificidad).

TP - Verdadero positivo.

FN - Falso negativo.

TN - Verdadero negativo.

FP - Falso positivo.

RESULTADOS

APLICACION DEL ANALISIS ESTADISTICO DE BAYES.

La sensibilidad y la especificidad son dos características útiles para validar la exactitud de una prueba, comparándola con una de referencia.

La sensibilidad (S) es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad, y se representa como $P(+IE)$. (probabilidad, P, de que la prueba sea positiva, +, dado, I, de que el individuo esta enfermo, E).

La especificidad (E) es la probabilidad de que la prueba sea negativa cuando el individuo realmente no tiene la enfermedad y se representa como $P(-IE)$. (Probabilidad, P, de que la prueba sea negativa, -, dado, I, que el individuo no esta enfermo, E).(15).

Resultados en las lecturas. Serológica (Hemoaglutinación pasiva e Inmunodifusión y Lectura de Aislamiento Viral.

	Pba de referencia		Aislamiento Viral
	+	-	
Pba. Diagnóstico	+ 29	0	
Hemoaglutinación pasiva	- 5	6	

$$P(+IE) \quad S = TP / TP + FN = 29/33 = 0.85$$

$$P(+IE) \quad E = TN / FP + TN = 7/7 = 1$$

	Pba de referencia		Aislamiento Viral
	+	-	
Pba. Diagnóstico de Inmunodifusión	+ 24	0	
	- 10	6	

$$P(+IE) \quad S = TP / TP + FN = 24/34 = 0.70$$

$$P(+IE) \quad E = TN / FP + TN = 7/7 = 1$$

Correlación de Hemoaglutinación Pasiva e Inmunodifusión con Aislamiento Viral.

En el presente trabajo, los verdaderos positivos (TP) correspondieron a los 29 casos en los que se detectó presencia de virus de Bronquitis Infecciosa tanto en Hemoaglutinación Pasiva como en Aislamiento Viral, los verdaderos negativos (TN) fueron aquellos en los que se descartó la presencia de Virus de Bronquitis Infecciosa en ambos procesos (solo 6), los falsos positivos (FP) fueron aquellos en los que en Aislamiento Viral se Detectaron Virus de Bronquitis Infecciosa pero en la Hemoaglutinación no (cero casos) o los falsos negativos (FN) fueron aquellos en los que en la Hemoaglutinación pasiva no se detectaron virus de Bronquitis Infecciosa pero en el Aislamiento Viral sí (5 casos).

Sustituyendo:

$$S = TP / TP + FN = 29 / (29+5) = 85$$

$$E = TN / FP + TN = 6 / (0+6) = 1$$

La probabilidad de que un evento ocurra es un número entre el 0 y el 1, por lo tanto el resultado de la prueba nos indica que los hallazgos de virus de Bronquitis Infecciosa mediante la prueba de Hemoaglutinación pasiva es una prueba con 85% de sensibilidad y un 100% de especificidad.

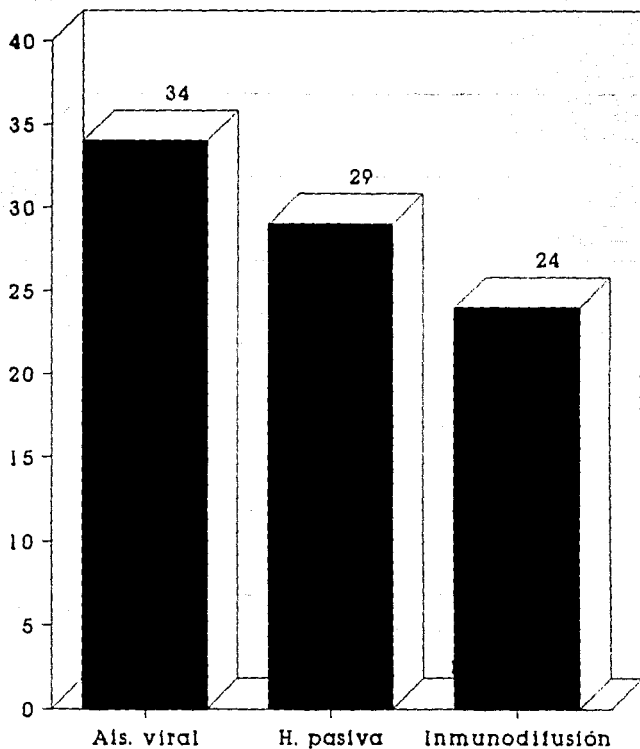
Correlación de Inmunodifusión con Aislamiento Viral, la prueba de Inmunodifusión se consideró poco sensible de un 70%, pero muy específica de un 100%.

CUADRO 1.: Resultados de las pruebas de Inmunodifusión, Hemoaglutinación pasiva y Aislamiento Viral.

No	.Clave	Inmunodifusión	Aislamiento Viral		
1	VBIA	+	+	+	
2	VBIA	+	+	+	
3	VBIC	+	+	+	
4	VBID	+	+	+	
5	VBID	+	+	+	
6	VBIG	+	+	+	
7	SBIA	-	+	+	
8	SBIB	+	+	+	
9	SBIC	-	-	+	
10	SBID	+	+	+	
11	SBIE	+	+	+	
12	VBIE	+	+	+	
13	VBI III	-	-	+	8 pase
14	VBI III	-	-	+	
15	SBI	+	+	+	
16	SBI III	-	+	+	
17	SBI IV	+	+	+	
18	11 PT	+	+	+	
19	13 PT	+	+	+	
20	12 TC III	+	+	+	
21	11 PT	-	+	+	
22	13 PT	+	+	+	
23	12 TC III	-	-	-	
24	12 PT	-	-	-	
25	13 PT	-	-	-	
26	91-381	-	-	+	
27	91-381 III	+	+	+	
28	91-383	+	+	+	
29	91-782	+	+	+	
30	91-235	+	+	+	
31	91-214	+	+	+	
32	91-299	+	+	+	
33	91-249	+	+	+	
34	43-216	-	+	+	
35	43-216	-	+	+	
36	2031	+	+	+	
37	13-2031	-	-	+	
38	91-335	-	-	-	
39	91-418	-	-	-	
40	91-385	-	-	-	
	TOTAL	24	29	34	

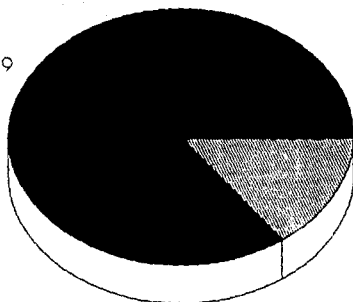
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

GRAFICA COMPARATIVA DE HEMOAGLUTINACION PASIVA
E INMUNODIFUSION CON RESPECTO AL AISLAMIENTO VIRAL



HEMOAGLUTINACION PASIVA.

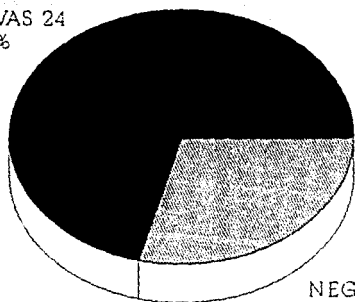
POSITIVOS 29
85%



NEGATIVOS 5
15%

INMUNODIFUSION

POSITIVAS 24
71%



NEGATIVAS 10
29%

DISCUSION

De acuerdo a la gran importancia de las pérdidas económicas por la BI en gallinas de postura y pollo de engorda, actualmente en nuestro país, se requiere de un diagnóstico rápido, seguro de un bajo costo.

La hemoaglutinación pasiva es una alternativa para el diagnóstico que aunado a una técnica adecuada y complementado con la prueba de aislamiento viral ofrece un apoyo optimo al clínico de aves para el diagnóstico de BI.

Es de vital importancia considerar que para tener un diagnóstico correcto por medio de la Hemoaglutinación pasiva, es necesario que se practique una correcta técnica durante la rápida toma de muestras debido a la sencibilidad del virus.

La evaluación estadística (Cuadro 2) indicó que hay poca diferencia entre la Hemoaglutinación pasiva con relación al aislamiento viral, considerando como ventajas en la Hemoaglutinación pasiva que se puede llevar acabo su lectura después de cuatro horas teniendo un 100% de especificidad corroborando así los resultados del trabajo realizado por el Crespo O. (1).

Dentro de las limitaciones de las técnicas nos encontramos que la Hemoaglutinación pasiva y en mayor grado la Inmunodifusión no sustituyen al aislamiento viral ya que las lesiones que produce el coronavirus a los embriones de pollo son característicos de la misma.

La observación de la Hemoaglutinación pasiva e Inmunodifusión como del aislamiento viral deben ser realizada por personal capacitado para ello, ya que esto reducirá el error del diagnóstico.

LITERATURA CITADA

1. Crespo O.: Aplicación de la hemoaglutinación como método de diagnóstico de bronquitis infecciosa, tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. México D.F. (1966).
2. González, O.; Viamontes O.; Fonseca, C.: Multiplicación de un aislamiento de campo (autóctono) del virus de la bronquitis infecciosa en embrión de pollo y su identificación con los antisueros Massachusetts y Connecticut. Revista cubana de Ciencias Avícolas. La Habana Cuba Vol 13 (2) 127-143.
3. Guilarte, O.; Viamontes, O.; Quintero, D.: Obtención de antisueros específicos contra el virus de la bronquitis infecciosa. Revista Avícola. La Habana Cuba Vol 30 (4) 251-257.
4. Hudson, L.; Hay, C.: Inmunología práctica. JIMS Barcelona 121-138 1979.
5. James, B.; ph. D.: Introducción a la inmunoquímica y a la inmunología. Panamericana. México D.F. 106-108 1983.

6. James, B., ph D.: Introducción a la inmuoquímica y a la inmunología. Panamericana. México D.F. 106-108 1983.
7. Jean A., Louis K., Quentin M.: Virología. Interamericana. México D.F. 19 1981.
8. Jean B.: Inmunología. Limusa. México D.F. 288 1981.
9. Kabat A.: Structural concepts in immunology and immunochemistry second. Holt Rinehart and Winston E.U.A. 53-58 1986.
10. Lamsda S.: Septimo seminario internacional de patología aviar. Athenas Georgia E.U.A. 256-363 (1990).
11. Lohr E.:Diagnosis of infectious bronchitis (IB) by examination of tracheal mucus for I.B. precipitating antigen. Avian Dis. Vol 25 (4) 1058-1065 (1985).
12. Manual de prácticas de inmunología: Instituto Politécnico Nacional. 42-43, 72-75 1983.
13. Margni A.: Inmunología • inmuoquímica fundamentos. Panamericana. 328-330 1982.

14. Méndez I., Namihira D., Moreno L., Sosa C.: El protocolo de investigación, lineamientos para su elaboración y análisis. Trillas. México D.F. 1990.
15. Mosqueda A., Lucio M.: Enfermedades comunes de las aves domésticas. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM 101-107 1986.
16. Pérez R.: Bronquitis infecciosa. Memorias de la primera jornada médico avícola. FMVZ-ANECA. México D.F. 40-49 (1990).
17. Romero A.: Comparación de las técnicas de hemoaglutinación pasiva, doble inmunodifusión y pruebas intradérmicas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Tesis de licenciatura Fac. de Est. Sup. Cuautitlán UNAM.
18. Sashil B., Sukanata K.: Virología veterinaria. Interamericana. 287 1988.
19. Winterfield R., Fadly A. and Hoerr F.: Immunization of chickens against adenovirus infection. Poultry Sci. 56 1481-1486 (1977).