

PURIFICACIÓN DE VACUNA ANTIRRÁBICA POR EXTRACCIÓN LIPÍDICA

J. De Filippo, C.C. Paolazzi

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
"Dr. Carlos G. Malbrán" Instituto Nacional de Producción de Biológicos.
Servicio Vacuna Antirrábica.

RESUMEN: Un nuevo método para la purificación de vacuna antirrábica fue desarrollado con el objeto de disminuir el contenido lipídico proveniente del sustrato animal empleado en la producción de vacuna. Dos técnicas extractivas fueron aplicadas sobre una vacuna de uso veterinario: uno de los métodos fue realizado empleando un homogeneizador Omnimixer Sorvall, seguido por centrifugación; el otro fue una extracción convencional realizada en ampolla de decantación. Ambos métodos fueron llevados a cabo utilizando *n*-hexano y *n*-heptano, alternativamente. La extracción con *n*-heptano en ampolla de decantación mostró ser adecuada para nuestro propósito disminuyendo el contenido lipídico en aproximadamente un 30% y preservando el 80% de la potencia de la vacuna con respecto al control.

PALABRAS CLAVE: Vacuna antirrábica, purificación, extracción lipídica.

PURIFICATION OF RABIES VACCINE BY LIPIDIC EXTRACTION

ABSTRACT: A new purification method for rabies vaccines was developed in order to diminish lipid content arising mainly from the animal substrate employed in vaccine production. Two extractive techniques were performed on a vaccine for veterinary use: one method was performed employing a Sorvall Omnimixer homogenizer, followed by centrifugation; the other was a conventional extraction carried out in a drop funnel. Both methods were performed with *n*-hexane and *n*-heptane, alternatively. Extraction with *n*-heptane in a drop funnel proved to be suitable for our purpose by diminishing lipid content some 30%, preserving 80% vaccine potency with respect to the control.

KEY WORDS: Rabies vaccine, purification, lipidic extraction.

Dirección para correspondencia: Dr. Claudio C. Paolazzi, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, Servicio Vacuna Antirrábica, Av. Vélez Sarsfield 563, (1281) Buenos Aires, Argentina. Teléfono: (54)-01-303/1806 al 11, interno: 225. E-mail: mhedrera@ffyba.uba.ar

INTRODUCCIÓN

Las vacunas antirrábicas producidas con tejido nervioso de animales adultos presentan dos desventajas importantes:

(1) una baja concentración de antígeno por dosis, lo que hace necesario largos planes de inmunización para lograr la cobertura deseada (Abdussalam y Bogel, 1971; Kuwert, 1967); y

(2) la presencia de tejido heterólogo, responsable de severas reacciones encefalomielíticas post-vacunales causadas principalmente por el llamado factor encefalitogénico, una proteína básica asociada a la mielina de composición predominantemente lipídica, procedente del tejido nervioso (Wolman, 1968; Chaleomchan, et al. 1990; Ubol, et al. 1990) y ligado a la causa de accidentes neuroparalíticos que van desde leves parestesias temporarias a daño neurológico permanente y eventualmente muerte (Hemachudha, et al. 1987; Swaddiwuthipong, et al. 1988).

Estas dificultades han sido reducidas por el empleo de animales lactantes (Fuenzalida y Palacios 1955; Gispén, et al. 1965; Svet-Moldavskij, et al. 1965) con los cuales se logró una mayor productividad viral y disminuir el riesgo por el factor encefalitogénico. La vacuna producida en cerebro de animales lactantes ha sido ampliamente usada en América Latina permitiendo el control de la enfermedad en la región. Los métodos de producción han sido modificados con la intención de minimizar los riesgos de accidentes post-vacunales provenientes del sustrato empleado, sin afectar la potencia de la vacuna. De esta manera, la utilización de animales de no más de un día de vida y la purificación por centrifugación de la vacuna a 17000 g (Larghi, et al. 1976) fueron algunas de las modificaciones más importantes realizadas para minimizar el contenido de mielina proveniente de la masa cerebral cosechada. Otra de las estrategias utilizadas es el empleo de ratas lactantes en lugar de ratones (Díaz, et al. 1989; Karakujumcan, et al. 1973; Segre 1984); este procedimiento permitió mantener una alta productividad viral ($10^6 - 10^7$ DL_{50 / 0,03 ml}) así como también una mayor masa infectada (50% mayor que en ratón), sin incrementar los riesgos causados por el factor encefalitogénico.

En el presente trabajo desarrollamos otra técnica de purificación la cual, combinada con el método de centrifugación a 17000 g, demostró ser una buena alternativa para disminuir el contenido lipídico y reducir en consecuencia el riesgo por el factor encefalitogénico. El proceso involucra la extracción de lípidos provenientes del tejido animal y fue aplicado a una vacuna veterinaria producida sobre la base de ratas lactantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de vacuna:

La vacuna empleada en este trabajo es del tipo Fuenzalida-Palacios; identificada como lote V-134 (uso veterinario). El método de elaboración de este tipo de vacuna consiste en utilizar ratas lactantes de hasta un día de vida provenientes de madres sanas y controladas. Diferentes lotes de ratas lactantes fueron inoculados intracerebralmente con las tres cepas de virus rábico fijo semilla 91, 51 y CVS. Luego de 72 horas de incubación, los animales con síntomas fueron sacrificados con cloroformo y la masa cerebral fue cosechada en forma aséptica en flujo laminar de seguridad biológica. Las diferentes cosechas de las cepas 51, 91 y CVS en relación 1:1:2 respectivamente, fueron diluidas convenientemente, homogeneizadas y centrifugadas a 17000 g a 4°C, 15 minutos. El sobrenadante así obtenido fue inactivado en forma continua utilizando un equipo Dill, por radiación germicida ultravioleta. La vacuna terminada consiste en una suspensión viral inactivada (diluida al 2,5%) conteniendo fenol y merthiolate como preservadores. La vacuna fue sometida a los controles de proceso sugeridos por OMS cuyos resultados se pueden observar en la Tabla N° 1.

Purificación de vacuna:

Se ensayaron extracciones utilizando dos solventes orgánicos, n-hexano y n-heptano grado analítico, esterilizados por medio de una membrana filtrante de 0,2 µm (Whatman poly cap 36 TF. Cat. n° 6700-3602). Las experiencias fueron realizadas según los métodos extractivos descriptos a continuación:

Método A: La vacuna fue mezclada con el solvente orgánico (n-hexano o n-heptano) en una relación 10:1 (vacuna:solvente) y posteriormente homogeneizada a máxima velocidad, a 4°C y por 10 minutos en condiciones de esterilidad; en homogeneizador Omnimixer Sorvall (Dupont Instruments Mod. 17106). La emulsión resultante de color blanquecina fue centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación se obtienen dos fracciones: una transparente acuosa inferior y otra de consistencia semisólida color marrón claro superior de aproximadamente 8 mm de espesor (emulsión estable). La fracción acuosa (llamada A_{aq n-hex} para la extracción realizada con n-hexano y A_{aq n-hep} con n-heptano) fue bombeada dentro de un kitasato, luego las trazas de solvente orgánico fueron removidas por burbujeo de nitrógeno estéril a través de filtro de 0,2 µm (Gelman acro 50 Cat. N° 4251) a 4°C durante 12 horas. La fracción acuosa fue utilizada en el ensayo de potencia y analizada su composición por electroforesis en SDS-PAGE.

La fracción semisólida (llamada $A_{\text{org n-hex}}$ para la extracción con n-hexano y $A_{\text{org n-hep}}$ con n-heptano) fue tratada posteriormente, con la finalidad de romper la emulsión y analizar la composición proteica por electroforesis en SDS-PAGE.

Método B: La vacuna contenida en ampolla de decantación fue tratada tres veces con el solvente orgánico (n-hexano o n-heptano), en una relación 30:1 (vacuna:solvente) cada vez. En los dos casos se obtuvieron dos fases claramente separadas. Una fase superior orgánica transparente y una inferior acuosa de aspecto similar a la vacuna original, aunque un poco más clarificada (llamada $B_{\text{aq n-hex}}$ para la extracción n-hexano y $B_{\text{aq n-hep}}$ con n-heptano). Las trazas de solvente orgánico en la fracción acuosa fueron removidas como se describió para el método A. La fracción acuosa fue utilizada en los ensayos de potencia y analizada su composición por electroforesis en SDS-PAGE.

La fracción orgánica (llamada $B_{\text{org n-hex}}$ para la extracción realizada con n-hexano y $B_{\text{org n-hep}}$ con n-heptano) fue analizada posteriormente por electroforesis en SDS-PAGE.

Controles:

Luego de finalizadas las experiencias extractivas los controles que se especifican más adelante fueron realizados sobre las diferentes fracciones.

Lípidos: Los lípidos totales fueron cuantificados en todas las fracciones acuosas, como así también en la vacuna de origen no tratada utilizada como control. El contenido lipídico fue determinado por un método colorimétrico basado en la reacción de la sulfosfovainillina (Postma y Stroes, 1968) modificado por nuestro grupo de trabajo como sigue: a) 2 ml de ácido sulfúrico concentrado fueron agregados a 500 μl de muestra; b) una vez mezclado, la solución fue calentada a 100°C en baño de agua por 10 minutos, luego enfriada a temperatura ambiente; c) a 500 μl de esta solución se agregaron 2,5 ml de reactivo (el cual consiste en ácido fosfórico 14 mol l^{-1} y vainillina 13 mmol l^{-1}); d) la solución obtenida fue mezclada por inversión y mantenida a 25°C durante 30 minutos; y e) el contenido lipídico fue determinado por lectura a 530 nm dentro de los siguientes 30 minutos (luego de los cuales el color no es estable). La solución blanco fue preparada agregando 2,5 ml de reactivo a 500 μl de ácido sulfúrico concentrado. La curva de calibración fue confeccionada empleando un "pool" de suero humano normal conteniendo 7080 mg l^{-1} (titulado con un estándar comercial) diluido en un rango de 800 mg l^{-1} a 2 mg l^{-1} ; los parámetros de regresión lineal obtenidos fueron: $m = 0.007629$ (s.e. 3%) y $r^2 = 0.98$. Se utilizó un pool de suero hu-

mano como control debido a que los lípidos de las muestras respectivas se encuentran en un contexto biológico de mayor similitud a este estándar que a uno de origen comercial.

Dosaje de solvente orgánico: La ausencia de solvente orgánico en las diferentes fracciones acuosas fue determinada por cromatografía gaseosa en un equipo Konik KNK-3000-HRGC empleando Supelco type capillary column Petrocol DH (i.d. 0.2 mm, 50 m long, film thickness 0.5 μm).

Potencia: Fueron evaluadas las potencias de las diferentes fracciones acuosas por el test de NIH (Seligmann, 1973). La vacuna estándar (lote 406/04/90) con un título de 1 UI ml^{-1} fue suministrada por el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ, Argentina) y el virus rábico de desafío fue una cepa CVS segundo pasaje con un título original de $10^{6.9}$ $\text{DL}_{50} / 0.03 \text{ ml}$. Se emplearon cuatro diluciones de las muestras respectivas y de la vacuna de referencia (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). La descarga viral fue realizada con 38 DL_{50} , titulada intraensayo.

Esterilidad: Las fracciones acuosas de las vacunas tratadas fueron sometidas a controles para establecer la presencia de hongos y bacterias empleando tres medios de cultivo diferentes: tioglicolato, soja y Sabouraud. Cinco diluciones seriadas 1:10 de las fases acuosas fueron realizadas en cada medio de cultivo. Las temperaturas y tiempos de incubación fueron: tioglicolato y soja, 7 días a 37°C, y 7 días a 25°C sucesivamente; Sabouraud, 14 días a 25°C.

Toxicidad específica: Este test tiene por objeto verificar la ausencia de virus rábico vivo en la vacuna. Se utilizaron tres especies de animales para el test, ratones de 18 - 20 gramos de peso, conejos y ratas lactantes, los que fueron inoculados intracerebralmente con 0,03 ml, 0,25 ml y 0,01 ml de vacuna inactivada, respectivamente. En nuestro laboratorio utilizamos 20 ratones, 2 conejos y 20 ratas lactantes, por lote de vacuna, atento a las recomendaciones internacionales (Seligmann, 1973). Estos animales se mantienen bajo observación 14 días durante los cuales deben permanecer libres de síntomas de rabia para considerarse una prueba satisfactoria.

Toxicidad inespecífica: Este test se utiliza para detectar cualquier sustancia tóxica que pudiera contener la vacuna.

Se utilizaron dos especies de animales, ratones de 20 gramos y cobayos de 350 gramos de peso, los que fueron inoculados vía parenteral con 0,5 ml y 5,0 ml de vacuna inactivada, respectivamente. En nuestro laboratorio utilizamos no menos de 2 animales por especie los que son observados por un período mínimo de 7 días. Los animales no deben presentar sig-

Tabla N° 1: Controles de producción efectuados sobre el lote de vacuna utilizado en el ensayo.

Vacuna Lote	Título DL ₅₀ ml ⁻¹	Esterilidad	Toxicidad específica	Toxicidad inespecífica	Timerosal mg ml ⁻¹	Fenol mg ml ⁻¹	pH
V-134	10 ^{3.8}	Satisfactorio	Satisfactorio	Satisfactorio	0,1	0,09	6,60

Tabla N° 2: Tabla comparativa de resultados de las diferentes fracciones acuosas y la vacuna control.

Test	Control ⁽¹⁾	A _{org.n-hex} ⁽²⁾	A _{aq.n-hep} ⁽²⁾	B _{org.n-hex} ⁽²⁾	B _{aq.n-hep} ⁽²⁾
Tox. inespecífica	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
Potencia (IU dosis ⁻¹)	3.00	0	0.04	0.12	2.43
Potencia % ⁽³⁾	100	0	1	4	81
Lípidos (mg l ⁻¹)	204	66	26	152	144
Lípidos % ⁽⁴⁾	100	32	13	75	71

(1) Vacuna Lote V-134, no tratada (2) Fracciones acuosas el Lote V-134 tratada por los diferentes métodos A y B. (3) Potencia porcentual referida al control. (4) Lípidos porcentual referido al control.

nos de enfermedad, disminución de peso o muerte durante el periodo evaluado para considerarse una prueba satisfactoria (Seligmann, 1973).

Análisis de proteínas virales por electroforesis en SDS-PAGE: Se analizaron las diferentes fracciones obtenidas por los dos métodos de purificación.

Fracciones correspondientes al método A: Las fracciones orgánicas (emulsiones estables semisólidas), A_{org.n-hex} y A_{org.n-hep}, fueron resuspendidas en un buffer PBS (pH = 7,20). Las fracciones acuosas correspondientes, A_{aq.n-hex} y A_{aq.n-hep}, y las resuspendidas, A_{org.n-hex} y A_{org.n-hep}, se centrifugaron a 20.000 rpm, 2 horas, en rotor Sorvall S-20 sobre un colchón de sacarosa 30%, con la finalidad de extraer las proteínas de la emulsión semisólida de las fracciones orgánicas y analizar los «pellets» correspondientes a las cuatro fracciones. En el caso de las fracciones orgánicas después de la centrifugación se obtuvieron 3 fases: una orgánica superior, una interfase semisólida de color marrón oscuro de 2 mm de espesor, y una fase acuosa inferior transparente con sus respectivos «pellets» (llamado P-A_{org.n-hex} el proveniente de la emulsión semisólida con n-hexano y P-A_{org.n-hep} el proveniente de n-heptano). En el caso de las fracciones acuosas, A_{aq.n-hex} y A_{aq.n-hep}, se obtuvieron dos «pellets», P-A_{aq.n-hex} y P-A_{aq.n-hep}, respectivamente.

Fracciones correspondientes al método B: Las fracciones orgánicas, B_{org.n-hex} y B_{org.n-hep}, y las fracciones acuosas, B_{aq.n-hex} y B_{aq.n-hep}, se centrifugaron a 20.000 rpm, 2 horas, en rotor Sorvall S-20 sobre un colchón de sacarosa 30%, obteniéndose los respectivos «pellets» (P-B_{org.n-hex}, P-B_{org.n-hep}, P-B_{aq.n-hex} y P-B_{aq.n-hep}).

Todos los «pellets» fueron resuspendidos en buffer desnaturizante (Tris-HCl 0,1 M, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 1%, PMSF 0,002 M, azul

de bromofenol 2 mg%, sacarosa 30%). Los «pellets» resuspendidos fueron calentados 3 minutos a 95°C y luego sembrados en un gel discontinuo de poliacrilamida (4% - 10%). La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje constante (100 volts) durante 1 hora 45 minutos. Las bandas se evidenciaron por coloración con azul brillante de coomasie.

RESULTADOS

Los controles de esterilidad fueron satisfactorios en todos los casos y no se encontraron trazas de solvente en las vacunas tratadas por los métodos A y B. El contenido lipídico y la potencia fueron medidas antes y después de las experiencias A y B, y los resultados se muestran en la Tabla N° 2. Empleando el método A, el contenido lipídico disminuyó considerablemente (se obtuvo una suspensión clarificada). No obstante, como se observa en la Tabla N° 2, el método A es muy drástico tanto en la técnica en que se utiliza n-hexano, como en la que se usa n-heptano, y las fracciones acuosas (A_{aq.n-hex} y A_{aq.n-hep} respectivamente) no retienen el suficiente valor antigénico para constituir una vacuna que supere el requisito mínimo de potencia exigido (rpm: 1,0 UI dosis⁻¹, para vacunas en cerebro de animales lactantes de uso veterinario). El análisis por electroforesis en SDS-PAGE coincidió con este resultado, no encontrándose bandas proteicas correspondientes en los «pellets» de las fracciones acuosas ni en los de las fracciones orgánicas.

Por otra parte el método B fue satisfactorio para nuestros propósitos: usando n-heptano (fase acuosa B_{aq.n-hep}), más del 30% de los lípidos contenidos en la vacuna original pueden ser eliminados preservando el valor antigénico por encima del mínimo requerido. Utilizando n-

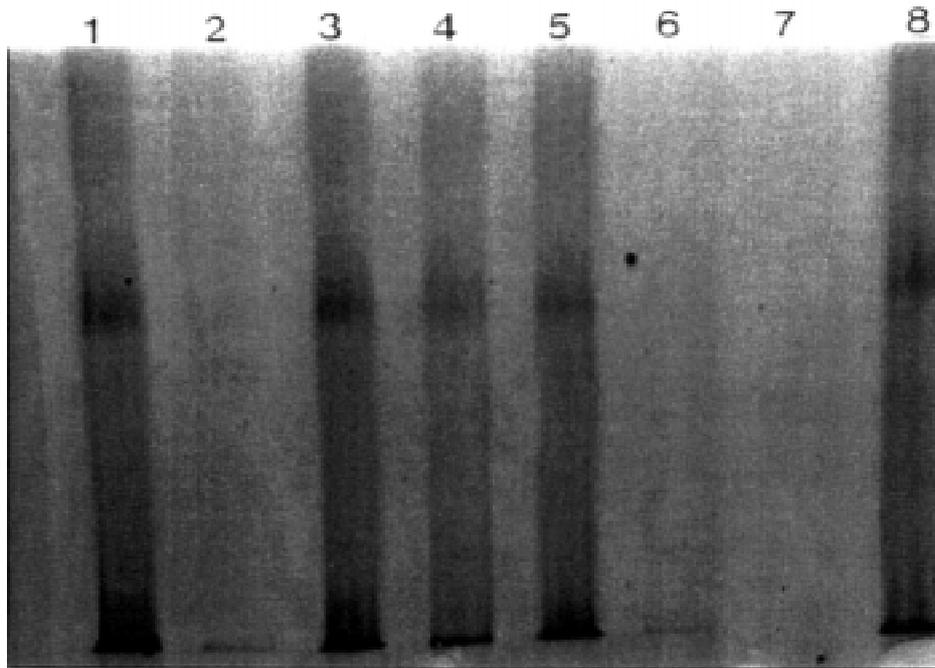


Figura N° I: Método B: Análisis por electroforesis en SDS-PAGE discontinuo (4-10%). Se describen a continuación las siguientes calles: 1- P-B_{org n-hep} (fracción orgánica n-heptano) concentrada 10:1; 2- P-B_{org n-hep} (fracción orgánica n-heptano) sin concentrar; 3- P-B_{aq n-hep} (fracción acuosa n-heptano); 4- P-B_{aq n-hex} (fracción acuosa n-hexano); 5- P-B_{org n-hex} (fracción orgánica n-hexano) concentrada 10:1; 6- P-B_{org n-hex} (fracción orgánica n-hexano) sin concentrar; 7- libre; 8- Control (vacuna sin tratar).

hexano no se obtuvieron resultados de potencia satisfactorios. El análisis por electroforesis SDS-PAGE reveló que en ambos casos (n-hexano y n-heptano) existe una pérdida de fracción proteica vacunal en la fase orgánica, no existiendo una diferencia cuantitativa significativa con ambos solventes (Figura N°I).

DISCUSIÓN

De los resultados anteriores puede inferirse que la extracción llevada a cabo en ampolla de decantación con n-heptano resulta ser una técnica de purificación satisfactoria la cual, combinada con una purificación previa por centrifugación, provee una vacuna antirrábica con un menor contenido lipídico, no mostrando una significativa reducción en su potencia. La pérdida de potencia aproximadamente un 20 %, está relacionada con la partición del contenido proteico entre la fase acuosa y el solvente orgánico, que pudo corroborarse por SDS-PAGE (Figura N° I).

El método A no fue satisfactorio para nuestro objetivo, puesto que las fracciones proteicas vacunales, la glicoproteína y la nucleoproteína viral principalmente, quedaron atrapadas en una emulsión estable semisólida de color marrón descrita anteriormente. Estas proteínas, reconocidas como los mayores inductores de la producción de anticuerpos protectores, no pudieron ser extraídas de la emulsión semisólida, no encontrándose ninguna banda por electroforesis en SDS-PAGE.

En el método B con n-hexano, aunque se evidencian proteínas en el gel de SDS-PAGE en la fase acuosa, los valores de protección hallados fueron muy bajos. Estos resultados indicarían que el método utilizado como así también el tipo de solvente y la relación utilizada podrían optimizarse para obtener un mayor rendimiento y minimizar la pérdida de valor antigénico. Por último, la relación costo beneficio para procesos productivos, ya sea en pequeña o gran escala, aún deben ser evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdussalam, M.; Bogel K. The problem of antirabies vaccination. International Conference on the Application of Vaccines Against Viral, Rickettsial and Bacterial Diseases of Man, Pan-American Health Organization, W.H.O., Washington, D.C. (USA), Scientific Publications No. 226: 1971 p 54-9
2. Chaleomchan, W.; Hemachudha, T.; Sakulramrungs, R.; Deesomchok, U. Anticardiolipin antibodies in patients with rabies vaccination induced neurological complications and other neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences* 1990; 96,2-3: 143-51
3. Diaz, A.M.; Dellepiane, N.; Palomo, L.F. Antirabies vaccine from the brain of the suckling rat: antigen composition and immunogenic capacity. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 1989; 107: 185-95
4. Fuenzalida, E.; Palacios, R. Rabies vaccine prepared from the brains of infected suckling mice. *Boletín del Instituto Bacteriológico de Chile* 1955; 8: 3-10
5. Gispén, R.; Schmittman, G.J.P.; Saathof, B. Rabies vaccine derived from suckling rabbit brain. *Archiv fuer die Gesamte Virusforschung* 1965; 15: 366-76
6. Hemachudha, T.; Phanuphak, P.; Johnson, R.; Griffin, D.; Ratanavongsiri, J.; Siriprasomsup, W. Neurologic complications of Semple-type rabies vaccine: clinical immunologic studies. *Neurology* 1987; 37: 550-6
7. Karakujumcan, M.K.; Pariz, B.M.; Solov'ev, V.D. Suckling rat brain vaccine. *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd edn., Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (ed.), W.H.O. Monograph Series No 23, Geneva, 1973 p 213-5
8. Kuwert, E. Versuche zur Antigenität Schutzkraft und Encephalitogenität der Hempt vaccine sowie Betrachtungen zur Tollwutschutzimpfung. *Deutschland Arch Hyg (Berlin)*, 1967; 151: 130-45
9. Larghi, O.P.; Varela Diaz, V.M.; Soto, E.; Imas, B.; Cuba Caparo, A.; Fuenzalida, E. Laboratory investigations on neuroparalytic accidents associated with SMB rabies vaccine III. Preservation of vaccine potency after elimination of murine brain myelin centrifugation. *Annals Institut Pasteur (Paris)*, 1976; 12B: 567-72
10. Postma, T.; Stroes, J.A.P. Lipid screening in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 1968; 22: 569-78
11. Segre, L. Antirabies vaccine for human use from suckling rat brain (letter). *Medicina (Buenos Aires)* 1984; 44: 220-1
12. Seligmann, E.B. The NIH test for potency. *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd edn., Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (ed.), W.H.O. Monograph Series No 23, Geneva, 1973 p 229-86
13. Seligmann, E.B. Semple-Type Vaccine. *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd edn., Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (ed.), W.H.O. Monograph Series No 23, Geneva, 1973 p 197
14. Svet-moldavskij, G.L. An allergen-free antirabies vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 1965; 32: 47-58
15. Swaddiwuthipong, W.; Weniger, B.G.; Wattanasri, S.; Warrell, M.J. A high rate of neurological complications following Semple anti-rabies vaccine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; 82: 472-5
16. Ubol, S.; Hemachudha, T.; Whitaker, J.N.; Griffin, D.E. Antibody to peptides of human myelin basic protein in post-rabies vaccine encephalomyelitis sera. *Journal of Neuroimmunology* 1990; 26: 107-11
17. Wolman, M. *Pathology of the nervous system*. Vol 1, Ed. Mc. Graw-Hill, Inc. New York (U.S.A), 1968; p 758-763.