

Revista de Saúde Pública

JOURNAL OF PUBLIC HEALTH

Resposta imune humoral de cães à vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil

Humoral immune response of dogs to the inactivated suckling mouse brain vaccine utilized in anti-rabies campaigns in Brazil

Marilene F. Almeida, Elizabeth A. C. Aguiar, Luzia A. F. Martorelli, Douglas Presotto, Marcelo M. Brandão e Octávio A. C. Pereira (in memorian)

Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil (M.F.A., E.A.C.A., L.A.F.M., M.M.B.); Vigilância Epidemiológica e Sanitária de Paulínia. Paulínia, SP - Brasil (D.P.); Instituto Pasteur de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil (O.A.C.P.)

ALMEIDA, Marilene F., Resposta imune humoral de cães à vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 31 (5): 502-7, 1997.

Resposta imune humoral de cães à vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil

Humoral immune response of dogs to the inactivated suckling mouse brain vaccine utilized in anti-rabies campaigns in Brazil

Marilene F. Almeida, Elizabeth A. C. Aguiar, Luzia A. F. Martorelli, Douglas Presotto, Marcelo M. Brandão e Octávio A. C. Pereira (in memorian)

Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil (M.F.A., E.A.C.A., L.A.F.M., M.M.B.); Vigilância Epidemiológica e Sanitária de Paulínia. Paulínia, SP - Brasil (D.P.); Instituto Pasteur de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil (O.A.C.P.)

Resumo

Introdução

A campanha anti-rábica no Brasil é realizada anualmente utilizando a vacina de cérebro de camundongos lactentes Fuenzalida-Palacios. A resposta imune humoral de cães vacinados durante as campanhas foi analisada objetivando avaliar se os cães apresentavam título protetor (0,5 UI/ml), 12 meses após a vacinação, e quantos deles alcançam esse título 30 dias após o reforço vacinal.

Material e Método

Foram analisadas 341 amostras de soro de cães domiciliados (259 do Município de São Paulo e 82 do Município de Paulínia), através da Técnica de Inibição de Focos de Fluorescência Rápida. A resposta imune foi avaliada considerando o estado nutricional do animal e o número de vacinações anteriores.

Resultado

A maioria dos cães não tinha título de 0,5 UI/ml após 12 meses, independentemente do estado nutricional, e a resposta humoral ao reforço vacinal mostrou-se melhor em cães com duas ou mais vacinações prévias.

Discussão

São discutidos o referencial de 0,5 UI/ml como título protetor para a espécie canina e a influência do estado nutricional e condição de saúde do animal como responsável pela resposta imune humoral.

Vacina anti-rábica, imunologia. Relação dose-resposta imunológica.

Abstract

Introduction

An anti-rabies campaign is undertaken annually in Brazil with of the Fuenzalida & Palacios vaccine. The humoral immune response of dogs vaccinated during the campaigns was researched with the objective of evaluating whether the dogs presented a protective titer (0.5 UI/ml) 12 months after vaccination and how many of these achieved this titer 30 days after a buttressing vaccination.

Material and Method

Three hundred and forty-one specimens of serum of dogs domiciled, 259 in the S. Paulo and 82 in the Paulinia counties, were analyzed utilizing the Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test. The immune response was evaluated taking into consideration the nutritional state of the animal and the number of previous vaccinations.

Results

The larger number of the dogs had not achieved the 0.5 UI/ml titer after 12 months, independently of the nutritional state and the response to the buttressing vaccination was more apparent in dogs with two or more previous vaccinations.

Discussion

The cut off of 0.5 UI/ml as protective titer in dogs and the influence of the nutritional state and health conditions of the animals as responsible for humoral immune response are discussed.

Rabies vaccine. Dose-response relationship, immunologic.

INTRODUÇÃO

O número de casos de raiva animal no Brasil permanece alto, 2.294 em 1993. Esse número é constituído principalmente por bovinos, eqüinos e cães¹³. Em 1995, foram notificados ao Ministério da Saúde 1.035 casos de raiva canina. Os cães estiveram envolvidos em 83,87% dos 31 casos de raiva humana ocorridos em 1995. A distribuição dos casos de raiva canina no Brasil é heterogênea, com as regiões Norte e Nordeste apresentando os maiores índices¹⁷.

O Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo, vem realizando desde 1972, no mês de agosto, como parte do Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, a campanha anti-rábica. Nos últimos 5 anos, a campanha conta com mais de 1.000 postos de vacinação distribuídos por toda a cidade, mantendo uma cobertura vacinal de 70%, com uma média de 800.000 vacinações, para uma população estimada em 1.200.000 cães. O último caso de raiva canina ocorreu em 1983, desde então a raiva no Município está sob controle⁵.

A vacina utilizada durante todo esse período foi a Fuenzalida-Palacios¹⁰, modificada¹⁵, de vírus rábico inativado, produzida em cérebro de camundongos lactentes, fabricada pelo laboratório TECPAR-Instituto de Tecnologia do Paraná, que recomenda revacinação a cada 12 meses. Sikes e col¹⁹, (1971) e Fields e col⁹, (1976), demonstraram que essa vacina conferia imunidade superior a 12 meses, quando administrada em dose única em cães.

Desde muito tempo, pesquisas têm demonstrado a importância dos anticorpos anti-rábicos neutralizantes, na profilaxia da infecção rábica. Esses anticorpos são essenciais na imunidade por intervir já nos primeiros estágios da infecção pelo vírus⁴. Portanto, a mensuração desses anticorpos é um

dos métodos para determinar a resistência do indivíduo à infecção.

Pesquisas realizadas por Dean e col.⁸ (1964) mostraram que quando cães vacinados apresentavam níveis detectáveis de anticorpos anti-rábicos, no soro, raramente sucumbiam à raiva em um desafio com vírus, enquanto a maioria dos cães vacinados sem anticorpos detectáveis no soro morriam.

Entre as proteínas do vírus rábico, somente a glicoproteína pode induzir a síntese de anticorpos neutralizantes para raiva⁶⁻²⁴. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a avaliação da imunidade anti-rábica através da titulação desses anticorpos e considera um título igual ou maior que 0,5 UI/ml como reflexo de um estado imunitário suficiente para proteger indivíduos expostos ao risco de contaminação. A resposta humoral não é o único mecanismo envolvido na proteção do indivíduo, os anticorpos são protetores concomitantemente aos mecanismos da resposta imune celular^{16,18}.

Com o objetivo de avaliar se cães vacinados durante a campanha apresentavam título protetor (0,5 UI/ml) 12 meses após a vacinação, e o título de anticorpos 30 dias após a vacina, realizou-se inquérito sorológico em 259 amostras de soro de cães do Município de São Paulo e 82 amostras do Município de Paulínia, correlacionando o estado nutricional e o número de vacinações anteriores na análise da resposta humoral dos cães.

MATERIAL E MÉTODO

Soros de 145 cães do Município de São Paulo foram coletados em agosto de 1994, durante a campanha anti-rábica (um ano após a campanha anterior) e uma segunda amostra de 114 dos 145 cães iniciais, foi coletada 30 dias após a vacinação, totalizando 259 amostras.

Soros de 60 cães do Município de Paulínia, foram coletados entre outubro de 1995 e janeiro de 1996 (um ano após a última vacinação), sendo que de 22 destes, também foi coletado sangue 30 dias após a vacinação, totalizando 82 amostras.

Os soros dos cães foram divididos em 4 grupos segundo o número de vacinas administradas anteriormente: A-não vacinados; B-vacinados uma vez; C-vacinados duas vezes; e D-vacinados três vezes ou mais.

Em São Paulo, o sangue foi coletado em oito postos de vacinação durante a campanha anti-rábica, escolhidos de forma aleatória. Os soros foram classificados em dois grupos: Grupo 1-estado nutricional ruim e semidomiciliados (75 animais); e Grupo 2-estado nutricional bom e domiciliados (70 animais). Foram considerados domiciliados os cães que pouco saem à rua e estão sempre acompanhados pelo dono, e semi-domiciliados os cães que saem à rua sozinhos e freqüentemente. Em Paulínia, o sangue foi coletado nos domicílios. Todos os cães de Paulínia eram domiciliados e apresentavam bom estado de saúde.

A vacina utilizada em todos os cães de São Paulo era do lote 155, fabricada em novembro/93, testada em 07/94 quanto à potência, pelo método de NIH, com um título de 1,4UI/dose. No Município de Paulínia foram usados diferentes lotes, todos aprovados segundo a mesma técnica.

A dosagem de anticorpos neutralizantes para raiva nos soros foi feita pela Técnica de Inibição de Focos de Fluorescência Rápida-RFFIT^{20,26}. Para essa técnica foi utilizado:

- conjugado anti-rábico fluorescente com título 1:20 elaborado pelo Setor de Imunologia do Centro de Controle de Zoonoses-SP pela técnica de Cromatografia em DEAE Celulose¹⁴;

- vírus PV (Vírus Pasteur) produzido em cultura de células "BHK-21 clone 13", previamente titulado;
- meio Eagle básico enriquecido com 10% de soro fetal bovino;
- soro padrão com 200 UI/ml procedente do Instituto Pasteur de Paris.

Os soros foram diluídos na base 10 de 1:10 até 1:320, em microplaca, incubados com vírus PV em estufa de CO₂ a 5%, por uma hora, a 37°C. Após este período foi adicionada célula BHK-21, retornando à estufa por 24 horas. O "tapete" celular foi fixado com acetona 80% gelada, corado com conjugado anti-rábico, em câmara úmida por uma hora. A leitura foi feita em microscópio de imunofluorescência.

A análise estatística dos resultados foi feita por qui-quadrado e coeficiente de Yule.

RESULTADOS

Os resultados da sorologia dos cães de São Paulo e Paulínia são mostrados na Tabela 1. Nos dois casos a maioria dos cães não apresentavam título de 0,5 UI/ml, 12 meses após a vacinação (1ª amostra) e a maioria respondeu ao reforço vacinal após 30 dias (2ª amostra).

Os dados da Tabela 2 quando analisados por qui-quadrado e coeficiente de Yule indicaram a independência dos fatores, ou seja, não houve relação entre a condição de reagente ou não dos soros e o estado nutricional dos cães ($p > 0,05$ ou $p > 0,01$).

Tabela 1- Sorologia de raiva em cães, pela técnica RFFIT, segundo local de origem dos animais, primeira e segunda amostra, 1994.

Table 1 - Rabies serology of dogs utilizing the RFFIT technique according to the origin of the animals, first and second specimens, 1994.

Título	Primeira amostra				Segunda amostra				Total	
	Reagente		Não reagente		Reagente		Não reagente			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
São Paulo	38	26,2	107	73,8	73	64,0	41	36,0	259	76,0
Paulínia	15	25,0	45	75,0	16	72,7	6	27,3	82	24,0
Total	53	15,5	152	44,6	89	26,1	47	13,8	341	100,0

RFFIT - Técnica de Inibição de Focos de Fluorescência Rápida.

Tabela 2 - Sorologia de raiva em cães, pela técnica RFFIT, segundo estado nutricional, primeira e segunda amostra, 1994.

Table 2 - Rabies serology of dogs utilizing the RFFIT technique according to their nutritional state, first and second specimens, 1994.

Resultado	Primeira amostra				Segunda amostra				Total	
	Reagente		Não reagente		Reagente		Não reagente			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
E. Nutricional										
Grupo 1	19	25,3	56	74,7	36	59,0	25	41,0	136	52,5
Grupo 2	19	27,1	51	72,9	37	69,8	16	30,2	123	47,5
Total	38	14,7	107	41,3	73	28,2	41	15,8	259	100,0

RFFIT - Técnica de Inibição de Focos de Fluorescência Rápida.

Tabela 3 - Sorologia de raiva em cães pela técnica RFFIT, segundo nº de vacinações anteriores, primeira e segunda amostra, 1994.

Table 3 - Rabies sorology of dogs utilizing the RFFIT technique according to the number of previous vaccinations, first and second specimens, 1994.

Resultado	Primeira amostra				Segunda amostra				Total	
	Reagente		Não reagente		Reagente		Não reagente			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Grupo A	1	2,6	38	97,4	8	27,6	21	72,4	68	26,3
Grupo B	3	18,3	13	81,2	6	46,2	7	53,8	29	11,2
Grupo C	9	50,0	9	50,0	13	86,7	2	13,3	33	12,7
Grupo D	25	34,7	47	65,3	46	80,7	11	19,3	129	49,8
Total	38	14,7	107	41,3	73	28,2	41	15,8	259	100,0

RFFIT - Técnica de Inibição de Focos de Fluorescência Rápida.

Tabela 4 - Sorologia de raiva em cães, pela técnica RFFIT, segundo nº de vacinações anteriores, segunda amostra, 1994.

Table 4 - Rabies sorology of dogs utilizing the RFFIT technique according to the number of previous vaccinations, second specimens, 1994.

Resultados	Segunda amostra					
	Reagente		Não reagente		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A ou B	14	33,3	28	66,7	42	36,8
C ou D	59	81,9	13	18,1	72	63,2
Total	73	64,0	41	36,0	114	100,0

RFFIT - Técnica de Inibição de Focos de Fluorescência Rápida.

A Tabela 4 reúne os dados dos grupos A e B (uma e duas vacinas administradas anteriormente) e grupos C e D (três ou mais vacinas anteriores) da segunda amostra, apresentados na Tabela 3. A análise estatística por qui-quadrado e coeficiente de Yule mostrou associação entre o número de vacinações anteriores e a resposta imune dos cães, ou seja, o número de doses vacinais interfere na resposta imune humoral ($p > 0,05$ ou $p < 0,01$).

DISCUSSÃO

No Programa Nacional de Profilaxia de Raiva, a vacinação canina é uma das atividades mais importantes e seu objetivo principal é manter índices imunogênicos protetores em animais domésticos, principalmente cães e gatos, diminuindo o número de animais suscetíveis.

A RFFIT, utilizada neste experimento, é recomendada pela WHO²⁵ (1992) por apresentar alta sensibilidade, especificidade e rapidez na obtenção dos resultados.

Os resultados do grupo A (não vacinados) mostram que esses animais não tinham anticorpos para raiva, antes da vacinação, o que confere confiabili-

dade aos dados fornecidos pelos proprietários (Tabela 3). A maioria dos animais dos grupos B, C e D não apresentavam título protetor após doze meses da vacinação, tanto no grupo 1 quanto no 2, mostrando que a vacina não confere imunidade prolongada e que o estado nutricional não é o fator preponderante na supressão. Esta observação é ratificada pelos resultados de Paulínia, onde 45 em 60 cães não tinham título protetor (Tabela 1) e todos eram animais saudáveis e bem nutridos.

A maioria dos animais dos grupos C (13/15) e D (46/57) foi reagente à vacinação em contraste com os grupos A (8/29) e B (6/13), demonstrando que o animal responde melhor após a segunda dose de vacinação.

Quando se discutem os fatores determinantes da queda do nível de anticorpos pós-vacinação, o estado nutricional dos animais é sempre citado como interferente na indução e manutenção da resposta imune humoral. A esse respeito Das e col.⁷, testando duas vacinas anti-rábicas de cultura celular e uma de tecido nervoso, concluíram que a resposta de anticorpos é sempre melhor em animais bem nutridos, independentemente da vacina utilizada.

Akakpo e col.⁷, analisando a resposta imune de 514 cães que receberam dose única de vacina anti-

rábica de cultura celular, observaram um decréscimo no número de animais protegidos de 74% , 30 dias após a vacinação, para 7,0% após 360 dias, fato atribuído à baixa condição de saúde dos animais, má nutrição, infecções e parasitoses.

Porém outros autores como Soares e col.²¹, 1991, analisando a resposta imune humoral de cães domiciliados e bem nutridos, também observaram a queda no título de anticorpos para raiva, induzidos pela vacina Fuenzalida-Palacios. Em 34 cães apenas 12 tinham título protetor após 12 meses. Com a revacinação, 29 cães apresentaram títulos maiores que 0,5UI/ml.

Segundo Haddad e col.¹², somente 24,2% (7/29) dos animais mantinham título protetor após 12 meses quando vacinados com vacina de cultura celular e 5,7% (2/35) com vacina de tecido nervoso. Esses autores discutem a existência de fatores intrínsecos (étnicos) que interferem na resposta imune, além do estado nutricional.

A via de administração da vacina e a sua manutenção sob temperatura adequada também são fatores citados como interferentes na resposta imune. Analisando os baixos títulos de anticorpos em cães vacinados com 2 tipos de vacinas anti-rábicas, Thomas e col.²³, 1994 concluíram que esses fatores e o estado nutricional dos animais não foram responsáveis pela resposta inadequada de anticorpos, uma vez que os mesmos lotes das vacinas foram usados em cães mantidos em condições ideais em laboratório, com resultados similares, considerando mais provável que os resultados sejam decorrência de fatores intrínsecos à vacina.

Todas as vacinas usadas nas campanhas anti-rábicas no Município de São Paulo, são previamente testadas pelo método NIH, recomendado pela OMS, porém muitos autores tem observado grande variabilidade dos resultados de potência de um mesmo lote de vacinas, quando testado várias vezes^{1, 22}, o que também foi observado nesse laboratório.

No presente experimento, a queda no nível de anticorpos não poderia ser decorrência de um problema localizado do lote de vacina usado em São Paulo, uma vez que os resultados observados em Paulínia, com diferentes lotes, são similares. O acondicionamento das vacinas em temperatura adequada e sua correta aplicação foram rigorosamente observados.

Deve-se considerar também que os estudos de Sikes e col.¹⁹ (1971) e Fields e col.⁹ (1976), com cães que receberam dose única de vacina de cérebro de camundongo lactente e mantiveram a imunidade por até 3 anos, foram realizados com animais mantidos em condições controladas de laboratório.

Germano e col.¹¹ (1982), analisando a resposta imune de cães domiciliados primo vacinados com a vacina Fuenzalida-Palacios, em condições de campo, observaram rápido declínio dos títulos de anticorpos para raiva, já aos 45 dias após a vacinação quando analisados pela técnica de Soroneutralização em Camundongos, e aos 60 dias quando analisados por Imunofluorescência Indireta.

Uma vez que o Município de São Paulo não apresenta casos de raiva há 13 anos, e considerando que os resultados indicam que a maior parte dos cães não apresentam os níveis recomendados de anticorpos 12 meses após a última vacinação, deve-se procurar analisar qual a explicação para a não-ocorrência de casos de raiva no Município.

O título de 0,5 UI/ml, considerado como suficiente para manter um indivíduo protegido, no caso de uma exposição natural ao vírus, pode estar superestimado para cães, uma vez que este parâmetro é uma extrapolação de experimentos realizados em camundongos. Testes de infecção experimental em cães poderiam ser realizados para estabelecer um valor mais apropriado à espécie canina. Aubert³ (1992) mostrou que usando títulos menores obtidos na Soroneutralização em Camundongos (0,03 UI/ml) ou na RFFIT (0,05 UI/ml), havia uma expectativa de sobrevivência pós-desafio de 95% dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBAS, A. et al. Termoestabilidade da vacina contra raiva, tipo Fuenzalida & Palacios, uso humano. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **34**:27-31, 1992.
2. AKAKPO, A.J. et al. Serologic response in dogs after a mass primary antirabies vaccination (inactivated vaccine) at Pikini Dakar (Senegal). *Dakar Med.*, **38**:123-8, 1993.
3. AUBERT, M.F.A. Pratical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.*, **11**:735-60, 1992.
4. BALTAZAR, M. & BAHAMANYAR, M. Essai pratique du serum antirabique chez les mordus par les loups enragés. *Bull. Org. Mond. Sante*, **13**:747-72, 1955.
5. CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES. Vacinação contra raiva. *São Paulo*, 1993. *Bol. Inf. Contr. Zoon. Urbanas*. **16**(1/2), 1993.
6. COX, J.H. et al. Rabies virus glicoprotein: biological and serological characterization. *Infect. Immun.*, **16**:754-9, 1977.

7. DAS, S.K. et al. Application of indirect fluorescent antibody test in determining the post vaccinal immune response against rabies in canine. *Indian J. Animal Health*, **26**:151-6, 1986.
8. DEAN, D.J. et al. Studies on the low egg passage flury strain of modified live rabies virus produced in embryonating chicken eggs and tissue culture. *Am. J. Vet. Res.*, **25**:756-63, 1964.
9. FIELDS, M. et al. Suckling-mouse-brain rabies vaccine: duration of immunity in dogs. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **71**:37-40, 1976.
10. FUENZALIDA, E. Vacuna de encefalo de raton lactante. In: *World Health Organization. Laboratory techniques in rabies*. Geneve, 1976. Cap. 23, 229-33. (Monography Series, 23).
11. GERMANO, P.M.L. et al. Avaliação da resposta imunitária da vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes aplicada em cães primo vacinados em condições naturais. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, **19**: 67-73, 1982.
12. HADDAD, N. et al. Activité de deux vaccins antirabiques employés lors de la primo-vaccination de chiens "tout venant" en Tunisie. *Rec. Méd. Vét.*, **161**:755-62, 1985.
13. INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTEÇÃO DE ALIMENTOS E ZOONOSES (INPPAZ). *Epidemiological surveillance of rabies in the Americas, Buenos Aires.*, 1994. v. 25.
14. LARGHI, O.P. *Anticuerpos fluorescentes para rabia, Centro Panamericano de Zoonosis*. Buenos Aires, 1975 (Nota Técnica nº 8, revisão 2).
15. MARKUS, H.L. et al. Vacina anti-rábica tipo fuenzalida modificada. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **13**:114-20, 1971.
16. MIFUNE, K. e col.. Essential role T cell in the post exposure prophylaxis of rabies in mice. *Microbiol. Immunol.*, **25**:895-904, 1981.
17. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional da Raiva. *Informes Técnicos*. Brasília, 1996.
18. PERRIN, P. et al. Rabies-specific production of interleukin-2 by peripheral blood lymphocytes from human rabies vaccines. *Vaccine*, **9**:549-58, 1991.
19. SIKES, R. et al. Rabies vaccines: duration of immunity study in dogs. *JAVMA*, **159**:1491-9, 1971.
20. SMITH, J. et al. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibodies. *Bull WHO*, **48**:535-41, 1973.
21. SOARES, I.C.G. et al. O cão, principal transmissor da raiva humana. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, **23**:119-22, 1991.
22. THRAENHART, O. et al. Results of inquiry on potency testing of rabies vaccine by the NIH test: suggestions for further improvement. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **8**:917-9, 1989.
23. THOMAS, R. E. et al. Immunogenicity of rabies vaccines used during an urban epizootic of rabies in Mexico. *Vaccine*, **12**:1259-64, 1994.
24. WIKTOR, T.J. et al. Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.*, **110**:269-76, 1973.
25. WORD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Rabies, Geneve, 1991. *Report*. Geneva, 1992.(WHO Technical Report Series, 824).
26. ZALAN, E. et al. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.*, **7**:213-5, 1979.