

MARCADORES SEROLÓGICOS DE HEPATITIS VIRAL B NO A - NO B EN PERSONAL DEL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS. San José, Costa Rica.

Dr. Jorge Armijo C.*
Dr. Sergio A. Herra S.*
Dr. Francisco J. Hevia U.*

Dra. Kirsten Visona.**
Dra. Emma Zamora S.**
Dr. Víctor M. Villarejos M.**

RESUMEN

Se estudiaron 200 muestras de sangre del personal médico y paramédico de diferentes servicios del Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Se encontró que un 11% era positivo para el virus de la Hepatitis B (HBV); 1% para el HBsAg (antígeno de superficie del virus de Hepatitis B) y 10% para el Ac-HBs (anticuerpo contra el antígeno de superficie del virus de Hepatitis B).

Se comparan estos hallazgos con lo encontrado en la población general (donadores de sangre) que fue del 0.8% para el HBsAg y 8% para el Ac-HBs y con los de una zona endémica de nuestro país como lo es San Ramón y Palmares cuyo porcentaje de positividad es del 10.5%

Para Hepatitis NA-NB se encontró un 20.5% de positividad: un 4.5% para el anticuerpo y un 16% para el antígeno. En dos casos (1%) se encontró positividad para ambos tipos de hepatitis.

No se demostró una diferencia significativa entre la población del Hospital y la población general en cuanto a HBV, aunque sí es mucho mayor su incidencia en diversas áreas laborales, especialmente en aquellas en contacto con productos sanguíneos o derivados.

Para Hepatitis NA-NB el porcentaje de prevalencia es elevado, similar al de la zona de mayor prevalencia en el país (San Ramón y Palmares con un 20%), usando el método de Ag/Ac del ICMRT¹, o test por inmunoprecipitina.

SUMMARY

Two hundred blood samples of medical and paramedical personel were studied from different sections of 'Hospital San Juan de Dios', San José, Costa Rica. 11% were found to be positive for Hepatitis B virus (HBV); 1% for HBs Ag (surface antigen of Hepatitis B virus), and 10% for Ac-HBs (antibody against the surface antigen of the Hepatitis B virus).

These findings are compared with what is found in the general population (blood donors) which was 0.8% for HBs Ag and 8% for Ac-HBs; and with an endemic zone in our country such as San Ramón and Palmares whose population with positivity is 10.5%

For Hepatitis NA-NB there was found a 20.5% index of positivity, with a 4.5% for the antibody and a 16% for the antigen. In two cases (1%) positivity was demonstrated for both types of hepatitis.

A significant difference was not demonstrated between the Hospital population and the general population in so far as HBV is concerned, even though there is a much higher incidence in specific work areas such as in those areas where the workers have direct with blood products or its derivatives.

The percentage of prevalence for NA-NB Hepatitis is elevated, similar to that of the area of highest prevalence in the country San Ramón and Palmares with 20%, using the method of Ag/Ac of ICMRT¹, or the test for immunoprecipitins.

* Servicios de Gastroenterología y Medicina Interna del Hospital San Juan de Dios.

** Centro Internacional para Investigación y Entrenamiento Médico de la Universidad de Louisiana (LSU-ICMRT)

INTRODUCCION

Es bien conocido que la exposición al virus de la hepatitis B es mayor para algunos grupos de población tales como: personal hospitalario, pacientes sometidos a diálisis, hemofílicos, talasémicos, adictos a drogas, homosexuales, hijos de mujeres portadoras (2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14). Estos pacientes están más expuestos a contacto con sangre, saliva, líquido duodenal, orina, semen, menstruación, leche de pecho, heces, calostro, secreción vaginal, secreción conjuntival, que son medios de transmisión del virus de la Hepatitis B (4-5-15-16).

Dentro del personal hospitalario hay grupos en donde el problema es más significativo, como en las unidades de hemodiálisis, laboratorio clínico, salas de operaciones, patología, emergencias (6-10-11-13-14-17-18), e incluso existen reportes de mayor contaminación entre el personal que los pacientes de unidades de hemodiálisis (19). A esto debemos sumar el hecho que el HBsAg contamina superficies ambientales en hospitales y pueden permanecer en ellas por largos períodos (14).

El cuerpo de cirujanos forma uno de los grupos de mayor riesgo de contraer la infección dentro de la profesión médica (4-6-13-20-21), incluso se menciona que en cirugías de más de 60 minutos en el 85% de los casos hay al menos un guante defectuoso (6), lo cual es importante recalcar pues está reportado que 0.001 cc de suero que contiene HBV es infeccioso por vía parenteral (6).

Estas condiciones de mayor riesgo adquieren más importancia con el conocimiento actual de la relación entre HBV y la hepatitis crónica (4-9-20-22-23-24-25-26-27-28-29-30): 10% de portadores crónicos la presentan y un 20% de los portadores crónicos desarrollan cirrosis hepática (18-20-24-31). Además, 5% evolucionan a carcinoma hepatocelular, con un riesgo mayor de 273 veces para portadores de HBsAg de desarrollarlo (4-18-20-24-25-32). Por lo tanto debe considerarse a la HBV como una enfermedad potencialmente oncogénica (4-26-29) con bases genéticas no bien determinadas, probablemente relacionadas con los antígenos de histo-compatibilidad (26). Desde 1982 se sabe que el HBV causa carcinoma hepatocelular y es el primer virus humano que se ha establecido como causa del cáncer (32).

El Hospital San Juan de Dios de San José, Costa Rica, recibe patología múltiple y cuenta con gran cantidad de servicios y personal con diferentes modalidades de exposición a enfermos infecciosos y su sangre o secreciones. Además no hay medidas y programas preventivos, lo cual puede resultar en una alta prevalencia de la infección por HBV.

Esto nos motivó a realizar un estudio horizontal de marcadores de hepatitis viral tipo B (HBsAg y Anti HBs) en personal de diferentes servicios del hospital, con el fin de

determinar la magnitud de dicho problema, identificar las áreas de mayor riesgo y establecer la diferencia de la prevalencia de esta infección con la población general con el fin de poder aplicar medidas preventivas y terapéuticas adecuadas.

Se incluye además un estudio sobre hepatitis NA-NB pues no conocemos en la actualidad un estudio de esta patología en el personal hospitalario, debido al problema de los marcadores serológicos en esta hepatitis.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en el Hospital San Juan de Dios, tomándose un total de 200 muestras de sangre de trabajadores de diferentes servicios que participaron voluntariamente, distribuidos en 14 grupos como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1
DISTRIBUCION DE POBLACION ESTUDIADA POR
AREAS DE TRABAJO

Area	No. examinado	% Distribución
Gineco-Obstetricia	7	3.5
Medicina Interna	10	5.0
Cirugía General	5	2.5
Hemodiálisis	6	3.0
Hematología	4	2.0
Oncología	7	3.5
Patología	21	10.5
Residentes e Internos	19	9.5
Laboratorio Clínico	24	12.0
Laboratorio RIA	5	2.5
Banco de Sangre	18	9.0
Enfermería Emergencias	4	2.0
Enfermería Medicina Interna	60	30.0
Unidad Cuidados Intensivos	10	5.0
Total	200	100.0

Los análisis serológicos para detectar la presencia de antígeno de superficie (HBsAg) y su anticuerpo (Ac-HBs) fueron realizados por métodos convencionales (33) en el Centro Internacional para Investigación y Entrenamiento Médico de la Universidad de Louisiana (LSU-ICMRT), en San José, Costa Rica. La serología para hepatitis NA-NB fue realizada en el mismo centro, utilizando el sistema de antígeno-anticuerpo del LSU-ICMRT (1) en un ensayo tipo ELISA.

Como grupos de control se utilizaron los resultados obtenidos en donadores voluntarios de sangre, escogidos al azar y los resultados obtenidos en las poblaciones de San Ramón y Palmarejos por el grupo del LSU-ICMRT, en dichas poblaciones hay una altísima incidencia de Hepatitis B (34).

RESULTADOS

Del total de la población estudiada, 22 personas (11%) tenían evidencia de contacto con el virus de la hepatitis B, de los cuales 2 fueron positivos para el antígeno de superficie (1%) 20 personas (10%) mostraron la presencia de anticuerpos en el suero; ninguna de las personas con evidencia de contacto con el virus había sido vacunada contra la hepatitis B. De las 22 personas solamente 5 (22.7%) recordaban haber tenido hepatitis clínica, porcentaje menor del mencionado por Denes y colaboradores en su estudio en médicos (13).

Los resultados de acuerdo a la distribución por áreas según positividad del HBsAg y Anti-Abs muestran que el porcentaje de positividad más alto corresponde a el Laboratorio Clínico (40.9%), luego el personal de enfermería (31.8%), Internos y Residentes (13.6%), personal de patología (9%) y personal de Oncología (4.5%). Tabla II y III.

Tabla II
CASOS POSITIVOS POR HBsAg o Ac-HB

Area	No. Muestras	HBsAg (+)	Anti-HBsAg (+)	Porcentaje
Gineco-Obstetricia	7	-	-	-
Medicina Interna	10	-	-	-
Cirugía General	5	-	-	-
Hemodiálisis	6	-	-	-
Hematología	4	-	-	-
Oncología	7	-	1	14.3 %
Patología	21	-	2	9.5 %
Residentes e Internos	19	1	2	15.8 %
Laboratorio Clínico	24	-	7	29.2 %
Laboratorio RIA	5	-	-	-
Banco de Sangre	18	-	2	11.1 %
Enfermería Emergencias	4	1	-	25.0 %
Enfermería Medicina	60	-	6	10.0 %
Unidad Cuidados Intensivos	10	-	-	-
Total	200	2	20	11.0%

Tabla III
CASOS POSITIVOS POR HBsAg o ANTI-HBS
POR GRUPOS (22 CASOS)

Servicio	No. Muestras	Porcentaje
Laboratorio	9	40.9%
Enfermería	7	31.8%
Residentes e Internos	3	13.6%
Patología	2	9.0%
Oncología	1	4.5%
Total	22	99.8%

Para hepatitis NA-NB se obtuvo un 4.5% de positividad para el anticuerpo y un 16% para el antígeno, con un total de 20.5%. En 2 casos (1%) se detectó la presencia de ambos tipos de hepatitis en un mismo individuo. La distribución por áreas para hepatitis NA-NB puede apreciarse en la tabla IV, aquí la relación con muestras de sangre es más difícil de sustentar, aunque el personal más expuesto a sangre y secreciones fue el que más positividad mostró: Enfermería, Cirugía, Oncología y Residentes e Internos, como se observa en la tabla V.

Tabla IV
CASOS POSITIVOS POR HEPATITIS NA-NB

Area	No. Personas examinadas	Positivos por antígeno	Positivos por anticuerpos	% pos.
Gineco-Obstetricia	7	1	-	14.2 %
Medicina Interna	10	2	2	40.2 %
Cirugía General	5	1	-	20.0 %
Hemodiálisis	6	-	-	-
Oncología	7	-	2	28.5 %
Hematología	4	1	-	25.0 %
Patología	21	2	-	9.5 %
Residentes e Internos	19	1	-	5.2 %
Laboratorio Clínico	24	3	-	12.5 %
Banco de Sangre	18	2	4	36.6 %
Laboratorio RIA	5	-	-	-
Unidad Cuidados Intensivos	10	3	-	30.0 %
Enfermería Emergencias	4	1	1	25.0 %
Enfermería Medicina	60	15	-	25.0 %
Total	200	32	9	20.5%
41 casos				

Tabla V
CASOS POSITIVOS POR ANTIGENO Y ANTICUERPO
HEPATITIS NA-NB POR GRUPOS (41 CASOS)

Servicio	No. Muestras	Porcentaje
Enfermería	17	41.5%
Laboratorio	9	22.0%
Medicina Interna	4	9.8%
Unidad Cuidados Intens.	3	7.3%
Oncología	2	4.9%
Patología	2	4.9%
Residentes e Internos	1	2.4%
Hematología	1	2.4%
Cirugía	1	2.4%
Gineco-Obstetricia	1	2.4%
Total	41	100.0%

DISCUSION:

Se ha reportado que en los Estados Unidos entre un 3.2 y un 10% de la población de donadores voluntarios de sangre son positivos para HBV por antígeno o anticuerpo (3-4-13-14-20), con un total de 200.000 infecciones cada año, quedando unos 20.000 nuevos portadores anuales (20). Sin embargo hay lugares con una mayor prevalencia como Hong Kong con un 15% (20).

En nuestro país en zonas endémicas como lo son San Ramón y Palmares, el porcentaje de positividad es de un 10.5% para HBV y 20% de anticuerpos anti NA-NB (comunicación personal del Dr. Villarejos). Lo anterior evidencia que no existe una diferencia marcada entre el riesgo que tiene el personal hospitalario (11% y 20.5% respectivamente) y nuestra población en zonas endémicas (10.5% y 20%).

Lewis y colaboradores (2) realizaron un estudio comparando el personal del hospital con los trabajadores no hospitalarios y encontraron que el Anti ABs era dos veces más frecuente que en los empleados del hospital, evidenciando el mayor riesgo de contacto con el virus. Denes (13) encuentra una frecuencia 5.25 veces mayor de riesgo de adquirir la hepatitis B para los médicos que para los donantes voluntarios de Sangre. De todos los médicos con evidencia de contacto, el 82% la habían adquirido después de iniciar su trabajo. Dienstang (14) encuentra una prevalencia 3.2 veces mayor en población hospitalaria. Hardt (21) encuentra en su estudio de 224 muestras de cirujanos daneses una frecuencia de anticuerpos 5 veces mayor en ellos que en población general. En este grupo la presencia del antígeno e (asociado a infectividad) en el suero del paciente que se somete a cirugía conlleva un mayor riesgo de contaminación que cuando dicho antígeno se encuentra negativo (27-28-35-36).

Idealmente debería de realizarse el Anticore (Ac-HBc) por cuanto es más sensible para la presencia del virus (4-14-30-31-37), ya que la hepatitis B puede ocurrir en ausencia de HBsAg detectable en suero (25-30-31). Omata (31) encuentra 3.6% de 194 pacientes con anti HBc positivo en suero, con HBsAg y Anti HBs negativos y con HBcAg positivos en el hígado. Igual observación hace Brechot (38) aunque encontrando un porcentaje mayor de HBsAg negativo y HBcAg positivo en hígado en portadores de hepatitis crónica activa, dato también mencionado por Kojima (30).

En nuestra serie el área de mayor problema resultó ser el laboratorio, en donde el manejo de material conteniendo sueros y sangre es muy frecuente, Lauer y colaboradores (17) estudiaron el material y las superficies de las áreas del laboratorio, encontrando que el 55% de los recipientes que contenían sangre, el 44% de los que contenían suero y el 34% de las superficies de laboratorio eran positivas por HBsAg.

Las unidades de hemodiálisis son reportadas como de alto riesgo con una positividad hasta de un 36% (19), sin embargo no es evidente esta situación en nuestro trabajo, tampoco se encuentra problema en los cirujanos, excepto en los oncólogos. El personal de enfermería resultó ser un grupo problema, pues hay contacto frecuente con pacientes sangrando, con vómitos y secreciones corporales, además de que el personal no se protege adecuadamente.

Se concluye, respecto a la HBV que su incidencia global es 1.25 veces mayor que la población general, existiendo áreas de mayor exposición como laboratorio, enfermería, oncología y médicos residentes e internos. En estos grupos deben aplicarse medidas preventivas y de ser posible la vacunación, con una vacuna que previene la morbi-mortalidad por hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (29).

Respecto al problema de la hepatitis NA-NB, es bien sabido la falta de una adecuada definición de este problema a nivel mundial por falta de marcadores serológicos universales. En nuestro país se estudia exhaustivamente (42) encontrándose que por el método Ag-Ac del ICMRT (1) el 20.5% de las muestras de nuestro personal hospitalario tienen evidencia de portar el antígeno o anticuerpo del virus NA-NB con mayor incidencia en el grupo de laboratorio y enfermería que maneja secreciones de pacientes, además de sangre y derivados. Existe una gran gama de test serológicos para su identificación, sin embargo con esta muestra queremos tratar de colaborar al estudio epidemiológico y clínico de esta entidad, aunque obviamente se necesitará más tiempo y estudios para definir su verdadero significado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Villarejos, VM et al: Evaluation of the specificity of an Immuno Precipitin test for NA-NB Hepatitis. *Journal of Infectious Diseases*. 1983; 147 (4): 702-710.
- 2.- Lewis, T.: Comparison of the frequency of hepatitis B antigen and antibody in Hospital and non Hospital personnel. *The New England Journal of Medicine* 1973; 289: 647.
- 3.- Mintz L. & Drew W.L.: Infecciones virales transmitidas por contacto sexual en varones homosexuales. *Clínicas Médicas de Norte América* 1983, (5) 1100-1102.
- 4.- Miller D. J.: Seroepidemiology of viral hepatitis. *Postgraduate Medicine*. 1980; 68: 137-148.
- 5.- Bryan, J.A., Carr H.E., Gregg M.B.: An outbreak of non-parenterally transmitted hepatitis B. *JAMA*. 1973; 223: 279-283.
- 6.- Rosenberg J.L., Jones D.P., Lipitz L.R., Kirsner J.B.: Viral hepatitis: an occupational hazard to surgeons? *JAMA*. 1973; 223: 395-400.
- 7.- Barker L.F., Peterson M.R., Shulman N.R., Murray R.: Antibody responses in viral hepatitis type B. *JAMA*. 1973; 223: 1005-1008.
- 8.- White A.C.: Medical disorders in drug addicts. *JAMA*. 1973, 223: 1469-1471.

- 9.- Rizzetto M., Purcell R.H., Gerin J.L.: Epidemiology of HBV-associated delta agent: geographical distribution of anti delta and prevalence in polytransfused HBsAg carriers. *Lancet*. 1980; 1215-1219.
- 10.- Pattison C.P., Maynard J.E., Berquist K.R., Webster H.M.: Epidemiology of hepatitis B in hospital personnel. *American Journal of Epidemiology* 1975; 101: 59-64.
- 11.- Parry M.F., Brown A.E., Dobbs L.G., Gocke D.J., Neult, C.: The epidemiology of hepatitis B infection in housestaff. *Infection*. 1978; 6: 204-206.
- 12.- Szmeness W., Stevens C.E., Zang E.A., Harley E.J., Keller A.: A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine (Heptavax-B): a final report. *Hepatology*. 1981; 1:377-385.
- 13.- Denes A.E., Smith J.L., Maynard J.E., Doto I.L., Berquist K.R., Finkel A.J.: Hepatitis B infection in physicians: results of a nationwide seroepidemiologic survey. *JAMA*. 1978; 239: 210-212.
- 14.- Dienstag J.L., Ryan D.M.: Occupational exposure to hepatitis B virus in Hospital personnel: infection or immunization? *American Journal of Epidemiology*. 1982; 115: 26-39.
- 15.- Villarejos V.M., Visona K.A., Gutiérrez Diermissen A., Rodríguez A.: Role of saliva, urine and feces in the transmission of type B hepatitis. *The New England Journal of Medicine*. 1974; 291: 1375-1378.
- 16.- Piazza M., Cacciatore L., Molinari V., Picciotto L.: Hepatitis B not transmissible via fecal-oral route. *Lancet*. 1975, 2: 706.
- 17.- Lauer J.L., Van Drunan N.A., Washburn J.W. et al: Transmission of Hepatitis B. virus in clinical laboratory areas. *Journal of Infectious Diseases*. 1979, 140: 513-516.
- 18.- Krugman S., Sherlock S. et al: Symposium on vaccination against hepatitis B. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. Supplementum 38, september 9, 1982.
- 19.- Pattison C.P.: Serological and epidemiological studies of hepatitis B in haemodialysis units. *Lancet*. 1973; 2: 173.
- 20.- Hilleman M.R., Nalon D.A., Popper H., Provost P.J., Zimmerman H.J.: I Congreso Mesoamericano y del Caribe y II Congreso Nacional sobre enfermedades del Hígado. San José, Costa Rica 24-26 de abril, 1985.
- 21.- Hardt, F.: Hepatitis B virus infections among Danish surgeons. *The Journal of infectious diseases*. 1976, 140 (6): 972-974.
- 22.- Boyer J.L., Chronic Hepatitis. *Disease a month*. 1979; 25 (4): 1-61.
- 23.- Reed, J.S.: Viral hepatitis: epidemiologic, serologic and clinical manifestations. *Disease a Month*. 1979, 25: 6-61.
- 24.- Talamo T.: Primary hepatic malignant lymphoma; its occurrence in a patient with chronic active hepatitis, cirrhosis and HCC associated with B viral infection. *Cancer* 1980; 46 (2): 336.
- 25.- Feinston S.M. & Hoofnagle J/H.: Non-A; maybe B hepatitis. *The New England Journal of Medicine*. 1984; 311: 185-189.
- 26.- Kew M.C., Gear A.J., Baumgarten J., Dusheiko G.M., Ma G.: Histocompatibility antigens in patients with hepatocellular carcinoma and their relationship to chronic hepatitis virus infection in these patients. *Gastroenterology* 1979; 7 537-539.
- 27.- Krugman S., Overby L.R., Mushwar I.K., Ling C.M., Frösn G.G., Deinhardt F.: Viral Hepatitis type B. *The New England Journal of Medicine* 1979; 300: 101-106.
- 28.- Brechot C., Scotto J., Charnay P., Hadchoul M., Degos Trepo C., Tillais P.: Detection of hepatitis B. virus KNA liver and serum: a direct appraisal of the chronic carrier state. *Lancet*. 1981; 2: 765-768.
- 29.- Szmuness W., Stevens C.E., Harky E.J., Zang E.A., Olesz W.R., William C., Sadovsky R., Morrison J.M., Kellner, Hepatitis B vaccine. Demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *The England Journal of Medicine* 1980, 303: 833-840.
- 30.- Kojima M., Udo K., Takahashi Y., Yoshizawa H., Tsuda Itoh Y., Miyakawa Y., Mayuni M. Correlation between tit of antibody to hepatitis B core antigen and presence of viral antigens in the liver. *Gastroenterology* 1977; 73: 664-668.
- 31.- Omata M., Afrovdakis A., Liew C.T., Ashcava M., Peter R.L.: Comparison of serum hepatitis B core antigen (HBsAg). *Gastroenterology* 1978; 75: 1003-1009.
- 32.- Beasley R.P.: Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma. Epidemiologic considerations. *Hepatology*. 1982; 2: 21 S-26 S.
- 33.- Engwall E.: Enzima-linkte immunoasorbent Assay (ELISA). *Immunochemistry* 1979; 9: 871.
- 34.- Villarejos V. M., Gutiérrez D.A., Pelon W. Identification of a type B hepatitis epidemic in Costa Rica. Comparative analysis of two outbreaks of viral hepatitis. *American Journal of Epidemiology*. 1972; 96: 373-378.
- 35.- Grady G.: Relation of antigenic infective of HBsAg-positive inoculation among medical personnel. *Lancet* 1976; 2: 494-493.
- 36.- Dienstag J.L.: Hepatitis B virus infection: More than meets the eye. *Gastroenterology* 1978; 75: 1172-1174.
- 37.- Hoofnagle J.H.: Serodiagnosis of acute viral hepatitis. *Hepatology* 1983; 3: 267-268.
- 38.- Brechot C., Trepo C., Minova-Bradistilova A., Deggt (Maupas P., Potet F., Benhamou J.P.): Hepatitis B core antigen in hepatocytes of patients with chronic active hepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 1980; 25: 593-596.
- 39.- Seef L.B., Hoofnagle J.M.: Immunoprophylaxis of viral hepatitis. *Gastroenterology*. 1979; 77: 161-182.
- 40.- Mulley A.G., Silverstein M.D., Dienstag J. L.: Indications for use of hepatitis B vaccine, based on cost-effectiveness analysis. *The New England Journal of Medicine*. 1982; 30 644-652.
- 41.- Baker C. H., Brennan J.M.: Keeping Health-Care workers healthy: Legal aspects of hepatitis B immunization program. *The New England Journal of Medicine*. 1984; 311: 684-686.
- 42.- Villarejos V.M., Visona K.A., Eduarte C.A., Provost P Hilleman M.R.; Evidence of viral hepatitis other than type A or type B among persons in Costa Rica. *The New England Journal of Medicine*. 1975; 293: 1350-1352.