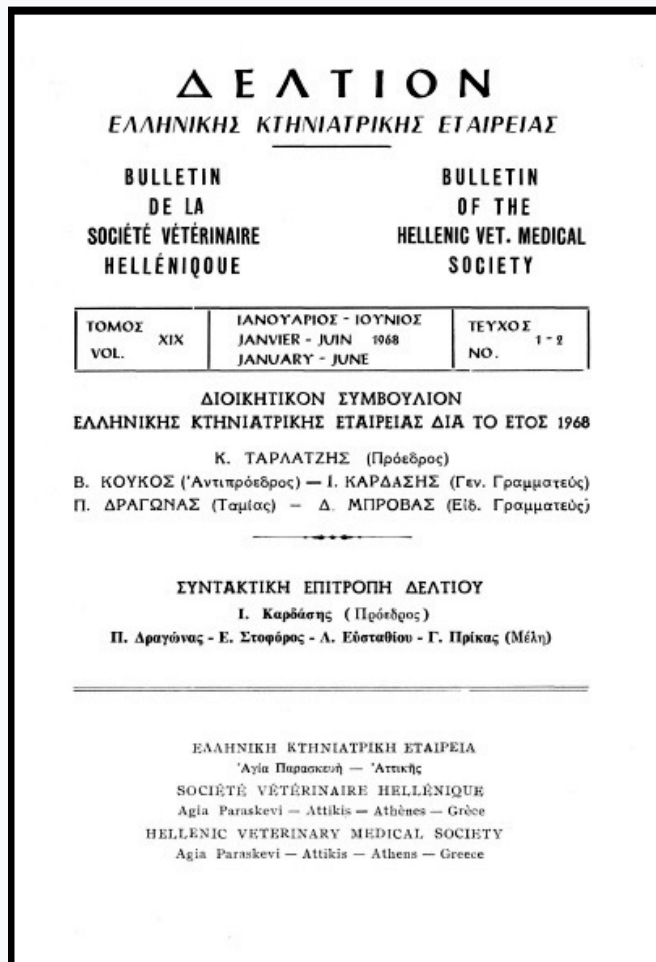


Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 19, No 1-2 (1968)



ΑΠΟΜΟΝΩΣΙΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΙΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΔΟΥΣ ΡΙΝΟΤΡΑΧΕΙΠΤΙΔΟΣ ΤΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ (ΛΡΒ) ΕΝ ΕΛΛΑΔΙ

Π. ΣΤΟΥΡΑΪΤΗΣ, Ι. ΚΑΡΔΑΣΗΣ

doi: [10.12681/jhvms.19952](https://doi.org/10.12681/jhvms.19952)

Copyright © 2019, Π.ΣΤΟΥΡΑΪΤΗΣ Ι.ΚΑΡΔΑΣΗΣ



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

ΣΤΟΥΡΑΪΤΗΣ Π., & ΚΑΡΔΑΣΗΣ Ι. (1968). ΑΠΟΜΟΝΩΣΙΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΙΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΔΟΥΣ ΡΙΝΟΤΡΑΧΕΙΠΤΙΔΟΣ ΤΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ (ΛΡΒ) ΕΝ ΕΛΛΑΔΙ. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 19(1-2), 66–70. <https://doi.org/10.12681/jhvms.19952>

ΑΠΟΜΟΝΩΣΙΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΙΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΔΟΥΣ ΡΙ- ΝΟΤΡΑΧΕΙΤΙΔΟΣ ΤΩΝ ΒΟΘΕΙΔΩΝ (ΛΡΒ) ΕΝ ΕΛΛΑΔΙ

(Πρόδρομος 'Ανακοίνωσις).

Υ π ό

Π. ΣΤΟΥΡΑ·Ι·ΤΗ ΚΑΙ Ι. ΚΑΡΔΑΣΗ

('Ινστιτούτον 'Αφθώδους Πυρετού - 'Αγία Παρασκευή - 'Αττικής)

Ἡ ΛΡΒ, γνωστή διεθνῶς ὑπὸ τὰ ἀρχικὰ τῆς Ἀγγλικῆς αὐτῆς ὀνομασίᾳς IBR·IPV (Infectious Bovine Rhinotracheitis-Infectious Pustular Vulvovaginitis), ἀποτελεῖ νόσον προσφάτου σχετικῶς περιγραφῆς (Schroeder καὶ Moys (1) 1954), τῆς ὁποίας ἡ ὑπαρξίς δὲν ἔχει εἰσέτι διαπιστωθῆ ἔν Ἑλλάδι. Οὐχ' ἦττον ὁμως, καθ' ἃ ἐκ πείρας γνωρίζομεν, ἡ γεννητικὴ μορφή τῆς νόσου, γνωστὴ σήμερον ὡς Λοιμώδης Φλυκταίνωδης Αἰδιο-κολπίτις, ὀφειλομένη εἰς τὸν αὐτὸν αἰτιολογικὸν παράγοντα (ἰόν), εἶναι εὐρέως διαδεδομένη ἔν τῇ χώρᾳ μας. Ὡσαύτως θεωρεῖται βέβαιον ὅτι περιπτώσεις ΛΡΒ, χαρακτηριζόμεναι κυρίως ὑπὸ ὑπερπυρεξίας καὶ ἀναπνευστικῶν φαινομένων, ἔχουσιν ἀσφαλῶς διαπιστωθῆ κατὰ τὸ παρελθόν, ἰδίᾳ ἐπὶ εἰσαγομένων πρὸς πάχυνσιν μόσχων καὶ ἐπὶ ἀγελάδων ἀκόμη, πλὴν ὁμως αἱ περιπτώσεις αὗται ἀπεδίδοντο εἰς διάφορα αἷτια καὶ ἰδιαιτέρως εἰς μικροοργανισμοὺς τοῦ γένους Παστερέλλα, οἵτινες, μέχρι τίνος, ἔθεωροῦντο ὡς μόνοι σχεδὸν ὑπεύθυνοι τῆς «Νόσου τῆς Μεταφορᾶς» (Shipping Fever). Ἐπίσης ἐγκεφαλίτιδες καὶ ἰδίᾳ πνευμονίαι ἐπὶ νεογεννῆτων μόσχων συχνάκις ὀφείλονται εἰς τὸν ἰὸν τῆς ρινοτραχειίτιδος.

Κατὰ μῆνα Μάϊον 1968, ἐδόθη ἡμῖν ἡ εὐκαιρία νὰ μελετήσωμεν ἐμπύρετον ἀναπνευστικὴν νόσον, συνοδευομένην καὶ ὑπὸ στοματικῶν ἀλλοιώσεων, ἐκδηλωθεῖσαν ἐπὶ μόσχων, ἄρτι εἰσαχθέντων ἐξ ὁμοῦ χώρας, πρὸς πάχυνσιν.

Τὰ ἐκ τῆς ἐργαστηριακῆς ἡμῶν ἐρεῦνης προκύψαντα πορίσματα προτιθέμεθα νὰ ἐκθέσωμεν ἐνταῦθα ἐν συντομίᾳ, μὲ σκοπὸν νὰ ἐπανέλθωμεν ἀναλυτικώτερον ἐπὶ τοῦ θέματος βραδύτερον.

ΙΣΤΟΡΙΚΟΝ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Συμφώνως πρὸς τὰ παρασχεθέντα ἡμῖν στοιχεῖα, τὴν 24·4·1968 διήλθον διὰ τοῦ Λοιμοκαθαρτηρίου Ζῶων Εἰδομένης 31 μόσχοι, μιγάδες Simmenthal, ἡλικίας ἀπὸ 6—8 μηνῶν, προοριζόμενοι πρὸς πάχυνσιν.

(1) J. Am vet. med. Ass., 1954, 125, 471.

Περὶ τὴν 15ην ἡμέραν ἀπὸ τῆς ἀφίξεως τῶν ζώων εἰς τὸν προορισμόν των, 12 ἐκ τούτων ἐξεδήλωσαν ὑψηλὸν πυρετὸν (40° - 42°), σιελόρροϊαν, δακρύρροϊαν, βῆχα καὶ δύσπνοϊαν. Πέντε ἐκ τῶν ἀσθενῶν ζώων ἐνεφάνισαν «ἐξάνθημα καὶ φλυκταίνας ἐπὶ τῶν χειλέων καὶ ἐντὸς τῆς στοματικῆς κοιλότητος». Ἐν ζῶον ἔθανε «μὲ συμπτώματα αἱμορραγικῆς διαρροίας».

Κατὰ τὰς ἐπομένους ἡμέρας, ἡσθένησαν 11 ζῶα τῆς αὐτῆς ἀποστολῆς καὶ μὲ τὰ αὐτὰ συμπτώματα. Κατὰ δήλωσιν τοῦ ιδιοκτῆτου, ἡ νόσος δὲν ἐπεξετάθη εἰς τὰ παλαιὰ ζῶα τῆς ἐκτροφῆς, εἰς ἃ περιελαμβάνοντο καὶ ἐξηυγενησμένα ἄγελάδες καὶ μόσχοι, φυλῆς Φριςλανδίας καὶ Schwytz.

Ἐκτὸς τοῦ μόσχου, ὅστις πιθανῶς ἔθανεν ἐκ τῆς νόσου, τὰ ὑπόλοιπα ἀσθενῆ ζῶα ἰάθησαν ἐν διαστήματι 8-10 ἡμερῶν.

Κατὰ τὴν ἐπιτόπιον ἐξέτασιν τῶν ζώων ὑφ' ἑνὸς ἐξ ἡμῶν (τὴν 5-6-1968), ἅπαντα τὰ ἀσθενήσαντα ζῶα εἶχον πλήρως ἀναρρώσει. Ἐπὶ ἑνὸς μόνον μόσχου διεπιστώθησαν μικραὶ ἐφελκίδες, μεγέθους καὶ χροιάς κόκκου φακῆς, ἐπὶ τοῦ ἄνω χείλους καὶ τοῦ ἀκρορρινίου.

ΔΗΦΘΕΝΤΑ ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΙΝ ΥΛΙΚΑ

Ἐκ τῶν ἀσθενησάντων ζώων ἐλήφθησαν πρὸς ἐξέτασιν τὰ ἑξῆς ὕλικά:

α) Αἷμα ἐκ πυρέσσοντος ζώου (Θ^ο 40, 7),

β) Αἷμα ἐκ τοῦ αὐτοῦ ζώου, 20 ἡμέρας μετὰ τὴν ἴασίν του (πρὸς λήψιν ὄρου).

γ) Ἐφελκίδες ἐκ τῶν ἀλλοιώσεων τῶν χειλέων καὶ τῆς στοματικῆς κοιλότητος, δι' ὧν ἀπεκλείσθη ὁ Ἄφθώδης Πυρετός, δι' ἐκτροφῆς τοῦ συμπληρώματος καὶ δι' ἐνοφθαλμισμού τῶν ὑλικῶν εἰς νεογενήτους λευκόμας καὶ κυτταροκαλλιέργειας.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Ἡ ἐν τῷ Ἐργαστηρίῳ διεξαχθεῖσα ἐν συνεχείᾳ ἔρευνα ἐπὶ τῶν ὡς ἄνω ὑλικῶν συνίστατο: α) εἰς ἀνίχνευσιν τοῦ ἐν τῷ αἵματι τοῦ πυρέσσοντος ζώου καὶ εἰς τὰς ἐφελκίδας, β) εἰς ἀνίχνευσιν ὀροφουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ἐντὸς τοῦ ὄρου τοῦ ἰαθέντος ζώου, καὶ γ) εἰς πειραματικὴν ἀναπαραγωγὴν τῆς νόσου.

I. ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΣ ΙΟΥ

Διὰ τὴν ἀνίχνευσιν τοῦ εἰς τὸ αἷμα καὶ τὰς ἐφελκίδας ἐχρησιμοποιήθησαν κυτταροκαλλιέργειαι κυττάρων ὄρχεως καὶ νεφρῶν μόσχου, παρασκευασθεῖσαι κατὰ τὰ γνωστὰ δεδομένα διὰ τὴν καλλιέργειαν τοῦ τοῦ Ἄφθώδους Πυρετοῦ. Ὡς ὑλικὸν συντηρήσεως

έχρησιμοποιήθη EARLE B. M. έμπλουτισθέν διά λακταλβουμίνης (0,5%), άνευ όρου, pH 7,4-7-5. Έκαστον φιαλίδιον BROCKWAY, έφ' ού ειχεν άναπτυχθή πλήρες κυτταρικόν ταπήτιον, ένωφθαλμίζετο δι' 1 ml ύλικού έφελκίδων (μετά λειοτρίβησιν και φυγοκέντρησιν) ή δι' αίματος (1 ml). Μετά προσρόφησιν επί 30' περίπου και έκπλυσιν του ταπήτιου, προσετίθετο τó ύλικόν συντηρήσεως. Αί καλλιέργειαι, τοποθετούμεναι έν κλιβάνω όριζοντιώς, ήλέγχοντο καθ' έκάστην πρόσ διαπίστωσιν έμφανίσεως κυτταρικών άλλοιώσεων, ένδεικτικών τής κυτταροπαθογόνου δράσεως του ίου.

Άποτελέσματα. Αί δι' ύλικού έφελκίδων ένοφθαλμισθεισαι κυτταροκαλλιέργειαι ουδεμίαν άλλοίωσιν παρουσίασαν μέχρι και την 8ην ήμέραν και εις τρεις διαδοχικάς διόδους. Άπ' έναντίας, εις τās δι' αίματος ένοφθαλμισθεισας καλλιέργειας, την 7ην ήμέραν κατά την πρώτην διόδον και άπό τής 3ης ήμέρας κατά τās έπομένας διόδους, παρετηρήθησαν σαφείς κυτταρολογικαί άλλοιώσεις, ώς κύτταρα διογκωμένα, σφαιρικά, στιλπνά, συνηνωμένα δίκην σταφυλής, με πρωτόπλασμα κοκκιώδες, άποκολλώμενα κατά τόπους έκ του ταπήτιου. Μετά χρώσιν δι' αίματοξυλίνης-ήωσίνης (καλλιέργειαι επί καλυπτρίδων εις σωλήνας Leighton), διεπιστώθησαν ένδοπυρηνικά έγκλειστα τύπου Α του Cowdry, καταλαμβάνοντα όλόκληρον σχεδόν τόν πυρήνα του κυττάρου, διαχωριζόμενα έκ τής άπωθημένης εις την περιφέρεια του πυρήνος χρωματινης ύπό λεπτής άλω.

Ό τίτλος του καλλιεργηθέντος ίου, κατά την 4ην διόδον, άνήρχετο εις $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml (Tissu Culture Infectious Doses 50%, εις τó ml).

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΙΣ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΟΣ ΙΟΥ (ΣΤΕΛΕΧΟΣ Μ/68).

Διά τής δοκιμασίας τής όροεξουδετερώσεως, έγένετο ή έπιβεβαίωσις ότι ό καλλιεργηθείς ίός, τόν όποιον θέλομεν άποκαλει στέλεχος Μ/68, προήρχετο πράγματι έκ τής έστίας τής νόσου, καθόσον ούτος έξουδετεροϋτο ύπό του άντιστοιχου όρου του ίαθέντος έν τή έστία μόσχου (έξ ού ειχε ληφθή τó αίμα, έκ του όποιου άπεμονώθη τó στέλεχος Μ/68), εις άραίωσιν 1/64.

Η περαιτέρω ταυτοποίησης του ίου Μ/68 έγένετο διά δοκιμασιών διασταυρουμένης όροεξουδετερώσεως, έκτελεσθεισών, ώς και ή προηγούμενη, επί ίστοκαλλιεργειών και διά τής μεθόδου: σταθερός ίός 100 μονάδες TCID₅₀/0, 1ml+όρος ήραιωμένος, κατά γεωμετρικήν πρόδον 2.

Αί έν λόγω δοκιμασίαι απέδωσαν τά έξής άποτελέσματα:

α) Ίός ΛΡΒ (IBR—στέλεχος Άμερικής)+όρος ίαθέντος ώς άνω μόσχου: έξουδετέρωσις εις άραίωσιν 1/64.

[β] Ἴος M/68 + ὑπεράνοσος ὄρος κονίκλου (παρασκευασθεὶς ἐκ στελέχους IBR Ἀμερικῆς): ἐξουδετέρωσις εἰς ἀραίωσιν 1/32.

Εἰς ἐτέραν ἀνάλογον δοκιμασίαν, μὲ σταθερὸν ὄρον καὶ ἀραίωσιν τοῦ ἰοῦ, τῇ ἐπιδράσει τοῦ ἀνωτέρω ὑπερανόσου ὄρου κονίκλου, ὁ τίτλος τοῦ ἰοῦ M/68 ἐμείωθη κατὰ 3 λογαριθμοὺς (ἀπὸ $10^{7.5}$ εἰς $10^{7.5}$. Δείκτης ἐξουδετερώσεως 3).

Οἱ ὡς ἄνω τίτλοι ὀροεξουδετερώσεως 1/32 καὶ 1/64 εἶναι λίαν ἐνδεικτικοὶ, ἀφ' ἑνὸς μὲν τῆς ὑπάρξεως εἰδικῶν ἐξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ἐντὸς τῶν ἐξετασθέντων ὄρων, ἀφ' ἑτέρου δὲ τῆς ταυτοτήτος τῶν δύο ὑπὸ σύγκρισιν ἰῶν, ἦτοι τοῦ ἰοῦ Λοιμώδους Ρινοτραχειίτιδος (στέλεχος Ἀμερικῆς) καὶ τοῦ ἡμετέρου ἰοῦ M/68.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Διὰ τὴν ἀναπαραγωγὴν τῆς νόσου ἐχρησιμοποιήθη μόσχος θήλυς, ἡλικίας 12 περίπου μηνῶν. Ἡ μόλυνσις τοῦ ζώου ἐγένετο δι' ἐνδοφλεβίου ἐγχύσεως 5 ml ἰοῦ καλλιεργείας, ἔχοντος τίτλον $10^{7.5}$ ml. Πρὸ τοῦ ἐνοφθαλμιμοῦ ἐλήφθη αἷμα πρὸς ἔλεγχον ἀντισωμάτων (ἀπουσία), ὡς καὶ ἡ θερμοκρασία τοῦ ζώου ($38^{\circ},5$).

Καίτοι ἀναγνωρίζεται γενικῶς ὅτι ἡ πειραματικὴ νόσος δι' ἰοῦ καλλιεργείας, εἰς τὴν περίπτωσιν τῆς ΛΡΒ, ὡς ἄλλωστε καὶ εἰς τὰς πλείστας ἰώσεις, διατρέχει πλέον ἡπίως, ἢ ἀναπαραχθεῖσα ἐν τῷ Ἰνστιτούτῳ νόσος ἐλάχιστα διέφερον εἰς σοβαρότητα συμπτωμάτων τῆς φυσικῆς νόσου, γεγονός, ὅπερ διεπίστωσε καὶ ὁ ἰδιοκτήτης τῶν νοσησάντων μόσχων, ἐπισκεφθεὶς τυχαίως τὸ Ἰνστιτούτον, κατ' ἐκείνην τὴν ἐποχὴν.

Ἦδη, 24 ὥρας μετὰ τὸν ἐνοφθαλμισμὸν, τὸ ζῶον ἐξεδήλωσε τὰ πρῶτα συμπτώματα ἀδιαθεσίας: $\Theta^{\circ} 40^{\circ},1$ (πρωΐα)- $41^{\circ},6$ (ἐσπέρας), ἐλαφρὰ ἀνορεξία, σιελόρροια, ρινικὸν ἔκκριμα ὀρῶδες, ἐξ ἀμφοτέρων τῶν ρωθῶνων. Κατὰ τὰς ἐπομένας δύο ἡμέρας, ἡ γενικὴ κατάστασις τοῦ ζώου ἐπεδεινώθη: $\Theta^{\circ} 41^{\circ},3$ - $41^{\circ},6$, τελεία ἀνορεξία, πλήρης κατάπτωσις, ταχύπνοια, σιελόρροια, πλέον ἄφθονος, ἐλαφρὰ δακρύρροια, τριγμὸς τῶν ὀδόντων, ἀραιὸς βήξις, ἐλαφρὰ ὑπεραιμία τοῦ στοματικοῦ βλεννογόνου, συνοδευομένη ὑπὸ μετρίας ἐξοιδήσεως τῶν θηλῶν, ἰδίᾳ κατὰ τὴν συνένωσιν τῶν χειλῶν. Ἀπὸ τῆς 4ης ἡμέρας παρετηρήθη βαθμιαία ὑποχώρησις τῶν συμπτωμάτων ($\Theta^{\circ} 40^{\circ},5$ - $40^{\circ},8$). Τὴν 5ην ἡμέραν ὁ πυρετὸς κατήλθεν εἰς $39^{\circ},5$ - $39^{\circ},2$ καὶ περὶ τὴν 8ην ἡμέραν τὸ ζῶον ἐθεωρήθη ἰαθὲν.

Ἐκ τῶν παθολογικῶν ὑλικῶν, ἅτινα ἐλαμβάνοντο τακτικῶς ἀνά 24ωρον (ρινικὸν καὶ ὀφθαλμικὸν ἔκκριμα, αἷμα) ἀπεμονώθη ἐκ νέου ὁ ἐνοφθαλμισθεὶς Ἴος M/68, ὅστις ἐξουδετεροῦτο: α) εἰς ἀραίωσιν 1/16 ὑπὸ τοῦ μετὰ 20 ἡμέρας ἀπὸ τοῦ ἐνοφθαλμιμοῦ ληφθέντος ὄρου τοῦ μόσχου. β) εἰς ἀραίωσιν 1/32 ὑπὸ τοῦ ὄρου τοῦ νοσήσαν-

τος ἐν τῇ ἐστία μόσχου, καὶ γ) εἰς ἀραίωσιν 1/32 ὑπὸ τοῦ ὑπεράνοσου ὄρου κονίκλου ἀντι-IBR (στελέχους Ἀμερικῆς).

Σ Υ Μ Π Ε Ρ Α Σ Μ Α

Ἐκ τῶν ἀνωτέρω προκύπτει ὅτι ὁ ἀπομονωθεὶς ἰός ἐκ νοσηρῶν μὲ ἀναπτυσσόμενα κυρίως συμπτώματα μόσχων παχύνσεως εἶναι ἰός Λοιμώδους Ρινοτραχειίτιδος τῶν Βοοειδῶν, τὸ πρῶτον διαπιστούμενος ἐν Ἑλλάδι. Αἱ μορφολογικαὶ ἀλλοιώσεις τῶν κυττάρων εἰς τὰς μεμολυσμένας καλλιέργειας καὶ ἰδίᾳ αἱ δοκιμασίαι τῆς διασταυρουμένης ὀροεξουδετερώσεως διὰ τοῦ Ἀμερικανικοῦ στελέχους τοῦ τῆς Νόσου Ρινοτραχειίτιδος τῶν Βοοειδῶν (IBR) πείθουν ἀρκούντως περὶ τῆς ταυτότητος τῶν δύο ἰῶν. Ὡς δὲ τονίζουσιν καὶ οἱ πλέον ἴσως εἰδικοί ἐπὶ τῆς ΛΡΒ Ἀμερικανοὶ ἐρευνηταὶ Mc Kercher καὶ Saito (1) «οὐδεὶς ἕτερος ἰός, ἐξ ὧν μολύνουσιν τὰ βοοειδῆ, δίδει διασταυρουμένην ἐξουδετέρωσιν μετὰ τοῦ ἰοῦ τῆς λοιμώδους ρινοτραχειίτιδος». Αἱ τελευταίως προστεθεῖσαι συμπληρωματικαὶ μέθοδοι διαγνώσεως τοῦ ἰοῦ διὰ φθοριζόντων ἀντισωμάτων καὶ τοῦ ἠλεκτρονικοῦ μικροσκοπίου ἀφοροῦν κυρίως εἰδικὰς περιπτώσεις, ὡς μικτὰς μολύνσεις (Gratzek καὶ συν. 2) ἢ ἐπανέλεγχον στελεχῶν (Fernelius καὶ Ritchie (3).

R É S U M É

Isolement et Identification du Virus de la Rhotrachéite Infectieuse Bovine chez des veaux d'engraissement.

Par

P. Stouraitis et J. Cardassis

(Institut de Fièvre Aphteuse-Aghia Paraskevi-Attikis-Grèce)

Le virus de la RTIB (IBR) a été isolé à partir d'une maladie à prédominance respiratoire observée chez des veaux d'engraissement. Ce virus titrant $10^{7.5}$ DCP (TCID₅₀)/ml au 4ème passage a été isolé du sang d'animal malade, prélevé eu période d'hyperthermie ($T^{\circ} 40^{\circ},7$).

L'identification du virus a été faite sur la base des altérations morphologiques des cellules en culture de tissus (testicules de veau) et surtout par des réactions sérologiques pour lesquelles on s'est servi d'une souche Américaine de virus IBR, aimablement envoyée par les Prof. Gillespie et Fabrykant que nous remercions ici très vivement. Les titres de neutralisation obtenus oscillaient entre 1/16, 1/32, et 1/64 (sérum hyperimmun de lapin ou prélevé che des animaux guéris 20 jours après le début de l'infection naturelle ou expérimentale).

(1) Proc. 68th Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Ass. 1964 p. 518-524.

(2) Am. J. vet. Res., 1966, 27, 1563-1582 καὶ 1583-1950.

(3) Am. J. vet. Res. 1966, 27, 241-248.