



Importancia de *Campylobacter* en avicultura (II)

● García FJ¹; Abad JC³; Pérez D²; Hurtado MD¹ y
● Echeita A²
●

INTRODUCCIÓN

En un número anterior de este medio -noviembre de 2004- hablamos sobre la campilobacteriosis en el ser humano y de los diferentes estudios que establecían que la carne de pollo y sus derivados podían constituir una importante fuente de infección para el hombre.

Dentro de la política de seguridad alimentaria que se ha denominado “del establo a la mesa”, el primer y más importante punto de control es conseguir que los animales lleguen al matadero libres de determinados agentes patógenos, en este caso de *Campylobacter* spp. Para intentar conseguirlo, es necesario conocer en profundidad la epidemiología de la infección con el fin de poder establecer las medidas de control más apropiadas. Por ello, en este artículo vamos a tratar de exponer como se infecta el pollo por *Campylobacter* spp y cuales son las

principales características de la infección.

Antes de ello, creemos que es necesario recordar que en la nueva Directiva Europea 2003/99/CEE de 17 de noviembre de 2003, la campilobacteriosis y sus agentes causales aparecen dentro del anexo I como agente zoonótico que debe ser objeto de vigilancia, siendo obligatoria la notificación del número de aislamientos, el registro de casos y la información a otros Estados. Sin embargo, no se establece ningún objetivo de reducción de la prevalencia ni la obligatoriedad de implantar planes de control. Esto es consecuencia de que la epidemiología de la campilobacteriosis es muy complicada y no se conoce con suficiente claridad como para asegurar que la aplicación de determinadas medidas tenga como resultado una disminución de la prevalencia. Por ello, no es extraño que a lo largo de este artículo se citen distintas investigaciones con conclusiones contradictorias acerca de la importancia de las diferentes fuentes de infección.

Por último, los autores estamos trabajando en el proyecto “**Caracterización molecular de las especies entéricas de *Campylobacter*: Aplicación de la genotipificación al estudio de las fuentes de infección. Papel de la transmisión vertical en aves**”. El objetivo inicial del mismo es determinar si existe transmisión vertical y en caso afirmativo analizar su papel como mecanismo de entrada de

la infección en la granja y estudiar y valorar el papel de otras posibles fuentes de infección. En esta revisión hablaremos de algunos de los resultados que hemos obtenido en este estudio.

PREVALENCIA DE *CAMPYLOBACTER* EN POLLOS DE ENGORDE

Los datos acerca de la prevalencia en diferentes países son limitados y difíciles de comparar. La proporción de lotes positivos varía mucho de unos países a otros tal y como se puede observar en la Tabla 1.

Estos datos deben interpretarse con cautela, ya que las diferencias entre los países pueden deberse en parte a diferentes sistemas de manejo, distinta densidad de animales, distancias entre unas granjas y otras, estado de las granjas, reglamentaciones zoonitarias diferentes, etc. También, otros factores que influirán en gran medida en los resultados de prevalencia serán la metodología de muestreo utilizada -tipo de muestra, número de granjas incluidas en el estudio, etc.- y la utilización de distintos métodos de aislamiento.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio han sido muy similares a los de países como Estados Unidos, Italia y Reino Unido. Se han analizado hisopos de cloaca de 20 lotes de pollos de engorde, considerándose el lote como

(* Dirección de los autores:

1-Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid). Carretera Madrid-Algete km 8,00. 28110 Algete (Madrid). Tel: 916290300 ext 107. Correo: fgarciap@mapya.es

2-Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología. Servicio de Bacteriología. Carretera Pozuelo-Majadahonda km 2,00. 28220 Majadahonda (Madrid). Tel: 918223615. Correo: aecheita@isciii.es

3-Cobb Española. C/ Varsovia nº 3. 28805 Alcalá de Henares (Madrid). Tel: 918890617.

Correo: juancarloscobbsa@logiccontrol.es

Tabla 1. Prevalencia de *Campylobacter* spp en lotes de pollos de engorde en diferentes países.

País	Prevalencia, %	Año de publicación
Estados Unidos	90	1995
	87,5	2001
Canadá	48	1984
Reino Unido	76	1993
	45	1997
	>90	2000
Dinamarca	42,5	2001
	44,6	2002
Holanda	82	1994
	57	1996
Noruega	18	1993
Suecia	27	1996
Alemania	41,1	1990
	47	1999
Italia	80	2000
Francia	42,7	2001
Malasia	82	1996

positivo cuando se aislaba *Campylobacter* spp a partir de uno o más hisopos. El germen fue aislado a partir de muestras de 18 lotes, siendo por tanto la prevalencia del 90%.

En el caso de reproductoras no hay muchos datos acerca de la prevalencia de campilobacteriosis. El más importante es un estudio realizado en Holanda en el que se analizaron 43 lotes y la prevalencia obtenida fue del 67%. En nuestra investigación, hemos analizado hasta el momento 29 lotes de reproductoras, de los cuales 17 fueron positivos en recría (58,6%) y 29 en puesta (100%).

CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN EN GRANJAS AVÍCOLAS

Experimentalmente se ha visto que la dosis de gérmenes que se necesitan para establecer la infección en el pollo es de tan solo 40 UFCs -unidades formadoras de colonia-. El *Campylobacter* coloniza inicialmente la capa

de moco situada encima de las células epiteliales del intestino, principalmente a nivel de los ciegos y el intestino delgado. Sin embargo, también es posible aislarlo a partir de otras partes del intestino, hígado y bazo. Aún en el caso de encontrarse en localizaciones extraintestinales, las aves infectadas son generalmente asintomáticas.

Una vez establecida la infección, la bacteria se multiplica rápidamente y puede llegar a alcanzar recuentos en los ciegos de hasta 10^9 UFCs, siendo entonces fácilmente detectable en heces. Además de esta multiplicación, estos organismos que han infectado al pollo pueden aumentar su capacidad de colonización entre 1.000 a 10.000 veces.

Todos estos hechos explican la gran rapidez con que se transmite la infección dentro del lote. Como el pollo es coprofágico y el primer pollo infectado elimina en las heces gran cantidad de bacterias con un alto poder de colonización, el resto de los animales del lote se infectará en muy pocos días. Así, en un plazo tan breve como 3-4 días el 100% del lote puede estar infectado.

En nuestro estudio hemos comprobado este hecho al tomar hisopos cloacales de un mismo lote a intervalos semanales. En gran parte de los casos, hemos visto como todas las muestras eran negativas una semana determinada y a la semana siguiente se aislaba el germen a partir del 90-100% de los hisopos.

En cuanto a la duración de la colonización y la excreción del germen, parece ser que puede variar de unas cepas de *Campylobacter* a otras. Sin embargo, en general puede decirse que dura toda la vida productiva en el caso del pollo de engorde. En infecciones experimentales se ha descrito que a partir de las 8 semanas disminuye tanto el número de animales infectados como la cantidad de gérmenes excretados por animal. Este hecho podría ser consecuencia de la respuesta inmune, pero no está del todo comprobado.

Sin embargo, los resultados que nosotros hemos obtenido en granjas de reproductoras son contrarios a este hecho. Así, lotes en los que el 100% de las muestras han sido positivas en el periodo de recría han seguido manteniendo la misma prevalencia en el momento del traslado, durante distintos momentos de la etapa de puesta y al final de su vida productiva a las 58-60 semanas de edad.

En la mayoría de los lotes que hemos analizado, se ha aislado más de una cepa o genotipo de *Campylobacter* y además estos genotipos han ido cambiando con el tiempo. Pudiera ser que la repuesta inmune frente a una determinada cepa no protegiese de la infección por otras cepas diferentes a ella, lo cual podría explicar que la prevalencia se mantuviese a lo largo del tiempo. Sin embargo, en algunos lotes solo hemos detectado un único genotipo y los resultados de prevalencia han sido similares a lo largo de todo el periodo de puesta.

Otra de las características de la infección por *Campylobacter* spp en pollos es que es dependiente de la edad.

Dicho en otras palabras, los pollos recién nacidos son libres de *Campylobacter* y una vez que se trasladan a la granja esta situación se mantiene hasta los 10-14 días de edad. A partir de este momento, la resistencia a la infección va disminuyendo.

Los motivos de este periodo refractario se desconocen. Un estudio reciente ha demostrado que los anticuer-

granja infectada -con anticuerpos maternos-. La mitad de los pollitos de cada lote se alimentaron con pienso de recría y la otra mitad con pienso de puesta.

Ninguno de los pollitos se infectó antes de los diez días de edad. Los primeros pollitos en infectarse fueron todos los alimentados con pienso de producción, independientemente de si

lación y por tanto el contacto con el ambiente que las rodea, incrementándose las posibilidades de contaminación.

El muestreo realizado y los resultados que hemos obtenidos no son suficientes como para permitirnos afirmar si en la zona de nuestro estudio la infección presenta o no estacionalidad. Sin embargo, sí que hemos observado que la mayor parte de los lotes de reproductoras en recría se infectaron en verano y comienzos de otoño.

FUENTES DE INFECCIÓN

•TRANSMISIÓN VERTICAL

Esta ruta de infección es postulada por investigadores de la Universidad de Athens -Georgia-, a partir de las observaciones realizadas sobre la prevalencia de *Campylobacter* en granjas avícolas y en la población de Islandia.

En este país todos los pollos de engorde que se consumen son producidos dentro de sus fronteras. La industria avícola está integrada y con un alto grado de control. Los huevos de abuelas se obtienen en Suecia, se incuban en Islandia y las reproductoras y pollos de engorde se crían en granjas con estrictas medidas de bioseguridad. El acceso a las granjas está limitado a veterinarios y granjeros. Además, el agua y los animales domésticos cercanos a las granjas se analizan periódicamente para determinar su papel como posibles fuentes de infección.

Utilizando técnicas de genotipado, se observó que las cepas de *Campylobacter* encontradas en una granja de reproductoras eran idénticas a las aisladas en una granja a veinte millas de distancia, en la que se criaban sus descendientes. El único nexo entre ambas era que los huevos se transportaban a la incubadora de la granja de pollos de engorde, situada a veinte millas.



Toma de muestras con hisopos cloacales para ver la prevalencia de *Campylobacter* en granjas de broilers.

pos de origen materno protegen parcialmente de la infección en este periodo y, dado que estos anticuerpos comienzan a disminuir hacia las dos semanas de vida, esta podría ser una de las causas de esta resistencia a la colonización.

También, en estos primeros días de vida, el intestino experimenta una gran cantidad de cambios fisiológicos, como por ejemplo la maduración de la inmunidad de la mucosa y cambios en la microbiota intestinal. A estos hechos se unen cambios de manejo, incluyendo la composición del alimento. Las consecuencias de estos cambios no se saben con certeza, pero algunos autores indican que podrían ser el motivo de este periodo refractario.

Nuestro grupo realizó una prueba de infección experimental utilizando dos lotes de pollitos de un día: un lote procedente de una granja libre de *Campylobacter* -sin anticuerpos maternos- y otro procedente de una

tenían o no anticuerpos maternos. Posteriormente, se infectaron todos los alimentados con pienso de recría, tanto los que venían de la granja libre de *Campylobacter* como los que procedían de la infectada.

De acuerdo con estos resultados, parece que la fisiología intestinal, la composición del alimento y los cambios que ésta induce en la microbiota del intestino tienen más importancia en la resistencia a la colonización que los anticuerpos maternos.

Por último, se ha observado que la campilobacteriosis en aves presenta cierta estacionalidad. Así, la proporción de lotes infectados es más alta en periodos cálidos que en épocas frías. Los motivos de este hecho se desconocen, pero probablemente sea debido a que en primavera y verano aumenta la carga de *Campylobacter* en el ambiente -mayor cantidad de insectos, ganado en el pasto, aves migratorias, etc- y además, las granjas aumentan la venti-

Varios estudios realizados con anterioridad mostraban que *Campylobacter* sobrevive durante muy poco tiempo en un ambiente seco. Si la bacteria estuviese sobre la superficie del huevo se desecaría y moriría durante el transporte. Por tanto, los investigadores suponen que para que la bacteria llegue de una a otra localización, tiene que ir en el interior. En consecuencia, el huevo fértil podría constituir una fuente de infección importante.

Posteriormente, el mismo equipo investigador aisló *Campylobacter* a partir de diferentes tramos del tracto reproductor, incluyendo el oviducto, de reproductoras. Asimismo, el germen fue aislado a partir de muestras de semen. Ambos hallazgos parecían confirmar la hipótesis de la transmisión vertical.

Sin embargo, varios hechos ponen en duda la importancia de este mecanismo de entrada:

-Experimentos de penetración y supervivencia de *Campylobacter* en el interior del huevo: distintos estudios han probado que las membranas de la cáscara son una barrera efectiva a la penetración de *Campylobacter* hasta el albumen.

Así, cuando se sumergieron huevos fértiles en una suspensión del germen, la bacteria no penetraba en el interior si los huevos se incubaban en atmósfera normal. En atmósfera de microaerofilia, el germen penetró y se aisló a partir de la cáscara, pero no a partir del albumen ni del vitelo. Aun así, la supervivencia de la bacteria en esa localización fue sólo de 6 horas.

-Análisis de lotes sucesivos de pollos de engorde descendientes de una granja de reproductoras infectada: en una misma granja, se analizaron 8 lotes consecutivos de pollos. La granja de reproductoras de la que procedían se mantuvo infectada durante todo el experimento.

Sin embargo, algunos lotes fueron colonizados y otros se mantuvieron libres.

-Utilización de métodos de genotipado con mayor poder de discriminación: un estudio realizado en Dinamarca utilizó la técnica de electroforesis en campo pulsante para estudiar la similitud entre cepas de *Campylobacter* aisladas en granjas de reproductoras y en varios lotes de su descendencia. Algunos lotes no se infectaron y en los positivos no se encontraron los genotipos presentes en las granjas de reproductoras.

-Periodo refractario: si la infección se produjera por esta vía, el germen debería detectarse en el pollito recién nacido. Aunque utilizando técnicas de PCR se ha detectado ADN de *Campylobacter* en muestras de plumón y cáscaras de huevos recogidas en la incubadora, no se logró el aislamiento del germen a partir de ellas. Esto hace suponer que el ADN detectado era de células muertas.

La mayor parte de los estudios indican que la ruta de transmisión principal del *Campylobacter* es la horizontal

Es posible que huevos con restos de heces, con la cáscara dañada y que no han sido desinfectados adecuadamente puedan introducir el germen en la incubadora. Algunos pollitos podrían infectarse en el momento del nacimiento y transmitir posteriormente la infección al resto del lote. Esto podría explicar porque en algunas ocasiones se han aislado cepas similares en reproductoras y su progenie.

En nuestro estudio, hemos analizado 29 lotes de reproductoras y 20 lotes de pollos de engorde descendientes de ellas. Todos los aislados de *Campylobacter* se genotiparon utilizando varias técnicas. En ninguno de los casos, los genotipos encontrados en pollos de engorde fueron los encontrados en los lotes de reproductoras.

Este hecho, unido al ya indicado de que nunca se detectó la infección antes de los diez días de edad, e incluso en un 50% de los lotes de reproductoras no se detectó hasta el comienzo de la puesta, nos permite decir que el papel de la transmisión vertical es prácticamente nulo en las condiciones de explotación de nuestro país.

•TRANSMISIÓN HORIZONTAL

La mayor parte de los estudios indican que la ruta de transmisión principal es la horizontal, es decir a partir de gérmenes que contaminan el ambiente de alrededor y del interior de las granjas.

En el caso de las fuentes abióticas, su importancia como fuente de infección guardará relación con la resistencia del germen. El *Campylobacter* no sobrevive por debajo de pH 4,9 y es muy sensible al oxígeno y a la deshidratación. En un ambiente seco a temperatura ambiente, la supervivencia del germen es corta. Sin embargo, a temperaturas de refrigeración y con humedad adecuada, puede sobrevivir durante semanas.

Los principales factores investigados como posibles fuentes de infección de las granjas han sido:

-**Pienso:** su baja humedad y una actividad de agua por debajo de 0,8 es incompatible con la supervivencia de *Campylobacter*. Además, el pienso se presenta normalmente granulado y es sujeto a temperaturas de pasteurización, lo cual destruiría la bacteria.

-**Cama:** las propiedades de la cama

fresca se consideran letales para *Campylobacter*. El germen nunca se ha aislado de la cama limpia y seca, no considerándose una fuente de infección.

Sin embargo, en países donde la cama no se saca de las naves y se deja para el lote siguiente, puede constituir una fuente de contaminación importante.

-Aerosoles: la persistencia de *Campylobacter* en el aire es escasa debido a la deshidratación, pero en una atmósfera cargada de humedad, el germen podría transmitirse a distancias considerables.

En el ambiente cerrado de las naves, la localización de los ventiladores puede aumentar el riesgo de contaminación. Por ello, al diseñar la granja deberá evitarse la colocación de tomas de aire cerca de áreas contaminadas, tales como incineradores de cadáveres, almacenes de material, etc.

-Insectos: los más frecuentes en las granjas serían moscas, escarabajos *-Alphitobius diaperinus-* y cucarachas. Aunque se ha demostrado que pueden ser portadores de *Campylobacter*, la bacteria sólo sobrevive sobre su cuerpo o en su intestino unos pocos días. Por tanto, su importancia como diseminadores de la infección es escasa.

Nuestros resultados apoyarían este hecho, ya que todos los intentos de aislamiento que hemos realizado a partir de insectos -principalmente *Alphitobius-* y otros invertebrados encontrados en las granjas, han sido nulos.

-Aves silvestres: El *Campylobacter* spp se aisló a partir de un 10% de las aves silvestres incluidas en un estudio realizado en Louisiana. Las que suponen un mayor riesgo para las granjas serían las paseriformes y columbiformes. Las anseriformes podrían contaminar la fuente del agua de bebida.

El riesgo que suponen está claramente relacionado con el estado de conservación de las naves -grietas, orificios, rotura de las mosquiteras, etc.- y con las prácticas de manejo. La práctica de abrir las ventanas para ventilar las naves aumenta las posibilidades de acceso de estas aves a su interior y, por tanto, el peligro de contaminación.

En las condiciones de nuestro estudio, creemos que el agua ha sido una de las principales fuentes de infección

-Otros animales domésticos y salvajes: diversos autores han considerado a los roedores como fuente de infección para las granjas avícolas. Por el contrario, son varios los trabajos en los que no se ha logrado aislar *Campylobacter* a partir de ratas y ratones capturados vivos en el exterior de las naves. Parece ser que la infección en estos animales es transitoria y no se consideran un factor de riesgo importante, sobre todo si la granja lleva a cabo un programa de control.

Un peligro mayor supone el ganado en extensivo y los animales de compañía en las cercanías de las explotaciones. Aunque estos animales no tengan acceso a la granja, pueden excretar gran cantidad de gérmenes y contaminar el ambiente circundante. Mediante el uso de marcadores moleculares se han descrito casos de lotes infectados por la misma cepa aislada en heces de ganado vacuno que pastaba en terrenos adyacentes.

-Agua de bebida: su importancia como fuente de infección podría

estar infravalorada ya que el aislamiento de *Campylobacter* a partir de la red de abastecimiento de agua es difícil.

La alta concentración en oxígeno del agua, la acción de los rayos UVA, la falta de nutrientes y los productos antimicrobianos hacen que la viabilidad de *Campylobacter* en las corrientes de agua disminuya rápidamente. Sin embargo, se ha comprobado que en estas condiciones la bacteria genera formas que son viables pero no cultivables, las cuales pueden sobrevivir durante periodos superiores a 4 meses. La capacidad de estas formas para colonizar al pollo no se ha estudiado en profundidad, pero algunos experimentos indican que ciertas cepas sí conservarían esta facultad.

Por otro lado, se ha comprobado que los biofilms que se forman en las tuberías y bebederos de las granjas prolongan la supervivencia de *Campylobacter*. Esto se debe a que la capa de polisacáridos extracelulares del biofilm protege a la bacteria de la acción del oxígeno y de la acción de los agentes químicos utilizados en el tratamiento del agua.

En las condiciones de nuestro estudio, creemos que el agua ha sido una de las principales fuentes de infección. Hemos aislado *Campylobacter* en varias ocasiones a partir del agua del pozo de una granja determinada. Posteriormente, se comprobó que alguno de los genotipos aislados en el agua eran los mismos que se aislaban a partir de las heces de los pollos de dicha granja.

Además, en algunas granjas de reproductoras se han realizado distintos tratamientos de las tuberías para eliminar el biofilm. En algunos casos, este tratamiento ha retrasado la colonización de forma significativa, lo cual sugiere que el agua podría ser el origen de la infección.

-Persistencia entre lotes: suponiendo que la cama no es reutilizada, esta vía de entrada estaría ligada a las operaciones de limpieza y desinfección que se realizan entre cada lote.

Varios estudios han mostrado que los genotipos que se aíslan en un lote son diferentes a los aislados en el lote siguiente. Esto indicaría que las operaciones de limpieza y desinfección son suficientes para la eliminación de *Campylobacter* del ambiente.

Las operaciones de limpieza y desinfección son suficientes para la eliminación de *Campylobacter* del ambiente

Sin embargo, estos mismos resultados se han observado en granjas donde no se realizan estas operaciones rutinariamente, lo cual refleja la escasa resistencia del germen a las condiciones ambientales.

Por el contrario, si parece que la positividad de un lote puede tener relación con el tiempo de vaciado entre lotes. Así, se ha visto que intervalos por encima de 14 días reducen la contaminación bacteriana dentro y alrededor de las naves.

En nuestra experiencia, sólo hemos aislado en una ocasión *Campylobacter* a partir de muestras del ambiente tras la limpieza y desinfección

de las naves. Es significativo añadir que este aislamiento se produjo a partir de muestras de suelo con humedad, lo cual indica la importancia de secar las instalaciones adecuadamente.

-Personal y medidas de bioseguridad: la bacteria puede ser introducida en la explotación avícola a través de botas, vestimenta y herramientas que se usan dentro de las granjas, como bolsas para recoger cadáveres, balanzas, etc.

Se han realizado diferentes estudios

sobre factores de riesgo asociados a la infección. En general, todos ellos consisten en encuestas acerca de las características de la granja y del sistema de manejo. Posteriormente, relacionan cuales respuestas están ligadas a la detección de lotes positivos.

Los principales factores de riesgo encontrados han sido:

- Separación entre exterior e interior de la granja o “barrera higiénica” inexistente o difusa. El riesgo de colonización disminuye cuando las explotaciones disponen de un vestuario o antecámara, botas para uso exclusivo

dentro de la granja y pediluvios con solución desinfectante.

- Mal estado de los edificios donde se alojan las aves.
- Aclarado de los lotes: se ha comprobado que las jaulas contaminadas en una explotación y limpiadas inadecuadamente han introducido la infección en la siguiente granja donde se realizó el aclarado.
- Periodo entre lotes sucesivos menor de 14 días.
- Renovar la solución desinfectante de los pediluvios menos de una vez por semana.
- Utilizar los pediluvios a partir de la entrada de los pollos, en vez de usarlos en todo momento o inmediatamente tras la desinfección.
- Limpieza y desinfección inadecuada de los depósitos de agua, conducciones y bebederos.
- Cercanía de otras explotaciones agropecuarias.
- Personal de la granja empleado al mismo tiempo en otras explotaciones avícolas o de otros animales domésticos.

BIBLIOGRAFÍA Y COMENTARIOS

Ponerse en contacto con los autores en los teléfonos y direcciones de correo indicadas.

Contenido en proteína y aminoácidos de las materias primas. (Viene de página 82)

Existen también ventajas a largo plazo derivadas de la correcta gestión de la variabilidad de los ingredientes: evaluación de materias primas y proveedores según la variabilidad, control óptimo de los márgenes de seguridad en la formulación, etc.

3. El control del contenido en aminoácidos de las materias primas es crucial para garantizar un pienso barato y que proporcione un adecuado

rendimiento en la producción animal. La tecnología NIR tiene mucho que aportar en este campo.

4. Una correcta gestión de la variabilidad durante la formulación va a permitir producir un pienso económico pero también seguro desde el punto de vista nutricional. La formulación estocástica puede convertirse en una posible alternativa frente a la tradicional programación lineal.

Bibliografía

- Brooke, A., Kendrick, D. y Meeraus, A. (1996). GAMS Release 2.25: A user's guide. GAMS Development Corp., Washington D.C.
- Herrman, T. (2002). Sampling: Statistical and Economic Analysis. Kansas State University. MF-2506. Mayo 2002.
- Schrage, L. (2000). Optimization modeling with LINGO. LINDO Systems, Chicago, III.
- Van de Panne, C y Popp, W (1963). Minimum cost cattle feed under probabilistic protein constraints. Management Sci., 405-430.