

# EFFECTO DE LA ESTABILIZACIÓN DE LA INMUNIDAD DE LAS CERDAS REPRODUCTORAS SOBRE LA EFICACIA DE PROGRAMAS DE VACUNACIÓN CONTRA LA PLEURONEUMONÍA PORCINA

## Effect of Immunity Stabilization in Reproductive Sows on the Efficiency of Vaccination Programs for Porcine Pleuropneumonia

V. Utrera<sup>1</sup>, E. Sogbe<sup>1</sup>, J. Villalobos<sup>2</sup>, L. Rausseo<sup>3</sup>, J.P. Cano<sup>1</sup> y D. Fuentes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

<sup>2</sup>Inversiones Porcinas (Yaracuy). Venezuela. <sup>3</sup>Aguarrem, Edo. Carabobo, Venezuela.

<sup>4</sup>Diag. Consultoría Veterinaria, Edo. Aragua, Venezuela.

### RESUMEN

La estabilización de la inmunidad de las cerdas madres ha sido adoptada recientemente como medida eficaz para el control del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino. En la presente investigación, la aplicación de este concepto para el control de la pleuroneumonía porcina, fue evaluada mediante la realización de ensayos de campo en diez granjas porcinas ubicadas en cuatro entidades federales de Venezuela. Los resultados de este estudio mostraron que el nivel de anticuerpos en la población de madres, antes de la estabilización de la inmunidad frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, fué altamente variable. El rango de madres seropositivas antes de la aplicación del plan de estabilización de la inmunidad estuvo entre 12 y 80%. El promedio de inmunidad calostrual humoral contra dicho microorganismo, detectada mediante una prueba de neutralización de actividad hemolítica en agar sangre, fue significativamente más baja ( $P > 0,05$ ) en granjas con una alta proporción de hembras seronegativas. Después de la vacunación del rebaño de reproductoras se observó, una menor variación en la duración de la inmunidad maternal (promedio de 7 semanas  $\pm$  1) y un incremento de 4 semanas en la duración de la inmunidad maternal con relación a la observada antes de la inmunización de las madres. La tasa de mortalidad por pleuroneumonía porcina fue significativamente reducida ( $P > 0,05$ ) en las diez granjas en donde la inmunización de todas las hembras reproductoras fue llevada a cabo. Por otra parte, no se observó efecto favorable del plan de vacunación de madres en el 30% de las granjas.

**Palabras clave:** Vacunación, pleuroneumonía porcina, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, perfiles serológicos.

### ABSTRACT

Stabilization of immunity in sows has been recently adopted as an efficient way of controlling Respiratory and Reproductive Syndrome in swine. This study showed that the level of antibodies in the sow population evaluated was highly variable. The range of seropositive sows to *Actinobacillus pleuropneumoniae* by natural infection was between 12 and 80%. The average duration of colostral immunity against *A. pleuropneumoniae* was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in farms with a high proportion of seronegative females. After vaccination of the breeding stock, less variation was observed on the duration of maternal immunity (average of 7 weeks  $\pm$  1) and a four - week increase in the duration of maternal immunity was observed in all the farms under study. The mortality rate associated with *A. pleuropneumoniae* was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the ten farms where vaccination of the gilts and the breeding stock was included. On the other hand, no positive effect of the vaccination program was observed in 30% (3/10) of the farms after stabilization of the immunity of the females, as demonstrated by a failure of the program to reduce the mortality associated with *A. pleuropneumoniae* infection.

**Key words:** Vaccination, porcine pleuropneumonia, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serum profiles.

### INTRODUCCIÓN

La estabilización de la inmunidad de las madres ha sido un concepto recientemente introducido como requisito para el control efectivo del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (SRRP) [2, 4, 5, 6, 7]; dichos estudios han demostrado que la introducción sistemática de cerdos seronegativos, en pobla-

ciones infectadas, potencia la diseminación del virus y permite que continuamente se presenten casos clínicos, perpetuando el SRRP en dichos rebaños. Existe escasa información acerca del efecto de la inmunidad de las cerdas madres sobre la eficacia de las medidas de control contra otras enfermedades del cerdo. La existencia de subpoblaciones de animales serológicamente negativos en rebaños infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae* y con el virus de la Influenza porcina, permite presumir que una situación similar a la reportada con el SRRP se presente en otras entidades infecciosas del cerdo [3].

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la existencia de subpoblaciones de hembras serológicamente negativas al *A. pleuropneumoniae* sobre los resultados del plan de vacunación con bacterinas autógenas elaboradas a base de cultivos inactivados y toxoide de la citolisinas Apx I o Apx II secretadas por las cepas de este microorganismo, aisladas en las poblaciones bajo estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Unidades experimentales

Diez operaciones porcinas de ciclo completo con un diagnóstico previo de pleuroneumonía porcina, fueron utilizadas para el presente estudio. El número promedio de madres por granja era de 600.

Las granjas estuvieron distribuidas en las siguientes entidades federales de Venezuela:

Estado Aragua: Granjas A, B y C.

Estado Carabobo: Granjas D, E, F, G y H.

Estado Portuguesa: Granja I.

Estado Yaracuy: Granja J.

### Perfiles serológicos

100 sueros porcinos fueron recolectados con el fin de estimar el nivel de inmunidad calostrada contra *A. pleuropneumoniae* en cada una de las 10 granjas evaluadas. Los lechones de edades comprendidas entre 3 a 12 semanas de vida, fueron seleccionados aleatoriamente en cada rebaño y divididos en diez grupos de 10 animales cada uno.

Para determinar el nivel de inmunidad humoral de las madres contra el agente causal de la pleuroneumonía porcina, cuarenta hembras, de cero a siete partos, fueron tomadas al azar, de cada granja, y divididas en 8 grupos de 5 animales por cada paridad y sangradas para la obtención de suero.

### Prueba de Neutralización de Actividad Hemolítica en Agar Sangre

La prueba de Neutralización de Actividad Hemolítica en Agar Sangre, fue realizada de acuerdo a la metodología pre-

viamente descrita [18]; para la preparación del antígeno, las cepas de referencia de *A. pleuropneumoniae* serotipos 1 al 12 fueron cultivadas por 18 horas a 37°C en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Difco, Detroit, MI) adicionado con 0.025% NAD (Eastman Kodak, Rochester, NY), 10% de extracto de levadura, 5% suero equino (Gibco, Salt Lake City, UT) y 0.1% de dextrosa. Al finalizar el período de incubación, las bacterias fueron recolectadas, lavadas en PBS y resuspendidas en una solución 0.15M de NaCl a una  $A_{650}$  de 0.2 la cual demostró corresponder a  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Para la realización de la prueba, 50  $\mu$ l de una suspensión bacteriana ajustada a la concentración previamente descrita, fue mezclada 1:1 con 50  $\mu$ l del suero a ser evaluado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 20  $\mu$ l de cada mezcla fueron colocados sobre la superficie de una placa de agar sangre de ovino al 1% e incubados por 18 horas.

La muestra control negativa consistió en una mezcla de la suspensión bacteriana más suero de un cerdo no expuesto previamente a *A. pleuropneumoniae*. Los sueros convalescientes obtenidos de cerdos experimentalmente infectados y con un título neutralizante de actividad hemolítica (TNH) >4096 fueron también colocados en la placa a ser evaluada y utilizados como muestra control positivo.

Una reacción positiva se caracterizaba por una completa ausencia de hemólisis alrededor del área de crecimiento bacteriano y una negativa por presencia de un halo completo de hemólisis en el área de crecimiento bacteriano. Una inhibición parcial de actividad hemolítica fue también considerada como negativa.

### Eficacia de los planes de vacunación contra pleuroneumonía porcina

La eficacia de la inmunización contra *A. pleuropneumoniae* fue determinada de acuerdo a la metodología previamente descrita [8, 9], por comparación entre los siguientes parámetros antes y después de la vacunación del rebaño de hembras reproductoras en las diez granjas porcinas objeto de este estudio:

1) Mortalidad promedio causada por pleuroneumonía porcina en la población de cada granja durante 12 semanas previas a la aplicación del plan de inmunización en madres y 12 semanas después de dicha aplicación. El diagnóstico de la causa de muerte de cada animal fue confirmado mediante la realización de necropsias, aislamiento e identificación del agente causal.

2) Prevalencia promedio de lesiones de pleuroneumonía porcina en cerdos enviados al matadero, durante el periodo arriba indicado.

### Proceso de vacunación

Las madres fueron vacunadas intramuscularmente 4 y 2 semanas pre-parto con 2 mL de una bacterina toxoide autógena preparada a base de cultivos de *A. pleuropneumoniae* ais-

lados en cada granja. Las hembras nulíparas fueron vacunadas dos veces con un intervalo de 2 semanas a los 180 días de edad.

Los cerdos destetados fueron inmunizados de acuerdo a los resultados del perfil serológico de cada rebaño a fin de determinar la duración de los anticuerpos calostrales contra *A. pleuropneumoniae*.

### Preparación de las vacunas autógenas

Las bacterinas autógenas de cada cepa de *A. pleuropneumoniae*, fueron preparadas según la metodología descrita [10, 11, 12, 13, 15, 17]. Para ello, cada cepa fue cultivada en medio líquido de infusión Cerebro Corazón adicionado de 0.025% NAD, y suplementado con 5mM CaCl<sub>2</sub>, para garantizar la expresión de Apx I, crecida hasta su fase logarítmica e inactivada con 0.2% de formalina y preparada en un adyuvante acuoso de hidróxido de aluminio.

### Análisis estadístico

Las diferencias en los promedios de animales serológicamente positivos fueron analizados mediante la prueba T de Student. Las diferencias en las tasas de mortalidad así como también en las prevalencias de lesiones de pleuroneumonía porcina detectadas a nivel de matadero, fueron evaluadas mediante la prueba de  $\chi^2$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se demostró que la proporción de animales positivos a *A. pleuropneumoniae* en la población de hembras reproductoras, era altamente variable. El rango de madres serológicamente positivas estaba entre 12 y 80%. El promedio de duración de inmunidad calostrales contra el agente causal de la pleuroneumonía porcina fue significativamente menor

( $P < 0,05$ ) en granjas con una alta proporción de hembras negativas TABLA I. Estos hallazgos contrastan con los reportados recientemente [15] que señalan que la mayoría de las granjas endémicamente infectadas en Norteamérica eran 100% serológicamente positivas. Sin embargo dichos autores no establecen la evolución de los perfiles serológicos a través del tiempo. Evidencias más recientes indican que la manifestación clínica de la enfermedad y la prevalencia serológica son procesos dinámicos que cambian a través del tiempo [16].

Después de inmunizar al rebaño de hembras reproductoras, se observó una menor variación en la duración de la inmunidad materna (promedio de 7 semanas +/- 1). De igual manera, los perfiles serológicos realizados en cerdos hijos de hembras vacunadas demostraron un incremento de 4 semanas en la duración de la inmunidad calostrales contra el agente bacteriano bajo estudio TABLA I. Estos resultados concuerdan con los reportados por Gardner *et al.* [15], quienes al evaluar la respuesta serológica frente a la infección natural con *A. pleuropneumoniae* serovar [7], en cerdos provenientes de hembras no vacunadas, en una explotación porcina en Australia, observaron que la duración promedio de la inmunidad calostrales era de 4 semanas. Por otra parte el número de individuos serológicamente positivos era muy bajo entre las 8 y 10 semanas de vida [15].

La tasa de mortalidad por pleuroneumonía porcina fue reducida significativamente ( $P < 0,05$ ) en el 70% (7/10) de las granjas en donde la estabilización de la inmunidad de las hembras de reemplazo y de las cerdas reproductoras fue realizada mediante la aplicación de un plan de vacunación a las madres. Por otra parte, en granjas con niveles de mortalidad bajos (inferiores a 2%) antes de la estabilización de la inmunidad de las cerdas madres, no fue observado ningún efecto de reducción de la mortalidad asociado con la aplicación de los programas de vacunación TABLA II. La estabilización de la inmunidad de las madres tuvo también un efecto similar sobre la prevalencia

TABLA I  
PORCENTAJE DE HEMBRAS SEROLÓGICAMENTE POSITIVAS (HSP) Y DURACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MATERNALES (DAM) EN LECHONES CONTRA *Actinobacillus pleuropneumoniae* ANTES Y DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN DEL REBAÑO DE HEMBRAS REPRODUCTORAS

Granja	HSP Antes Vac. (%)	DAM Antes <sup>1</sup>	HSP Después Vac. (%)	DAM Después <sup>1</sup>
A	60	3	100	7
B	60	2	100	6
C	24	3	100	7
D	12	3	100	7
E	56	3	100	7
F	58	2	100	6
G	80	4	100	8
H	50	2	100	6
I	70	4	100	8
J	52	4	100	7

<sup>1</sup>Número de semanas.

**TABLA II**  
**EFFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CONTRA *A. pleuropneumoniae* SOBRE LA MORTALIDAD POR PLEURONEUMONÍA, DESPUÉS DE LA ESTABILIZACIÓN DE LA INMUNIDAD DEL REBAÑO DE REPRODUCTORAS**

Granja	Mortalidad Pn/Antes	Mortalidad Pn/Después	Diferencia
A	8 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	4
B	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1
C	2 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	0,5
D	5 <sup>a</sup>	0,1 <sup>b</sup>	4,9
E	7 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	5
F	6 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	5
G	6.4 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>	5.3
H	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1
I	3.5 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	2.5
J	3.8 <sup>a</sup>	0.5 <sup>b</sup>	3.3

Medidas con letras distintas en la misma fila difieren significativamente (P <0,05)

Mortalidad/Pn: Tasa de mortalidad asociada a pleuroneumonía porcina.

**TABLA III**  
**EFFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CONTRA *A. pleuropneumoniae* SOBRE LA PREVALENCIA DE LESIONES DE PLEURONEUMONÍA A NIVEL DE MATADERO, ANTES Y DESPUÉS DE LA ESTABILIZACIÓN DE LA INMUNIDAD DEL REBAÑO DE REPRODUCTORAS**

Granja	Pr Pn/Antes	Pr Pn/Después	Diferencia
A	12 <sup>a</sup>	2.1 <sup>b</sup>	9.9
B	10 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	7
C	21 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	16
D	15 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	4
E	25 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	15
F	18 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>	11
G	16 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	15
H	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
I	1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1
J	12 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	10

Medidas con letras distintas en la misma fila difieren significativamente (P < 0,05)

PrPn: Prevalencia de lesiones de pleuroneumonía detectadas en cerdos a nivel de matadero.

de lesiones de pleuroneumonía detectadas a nivel de matadero TABLA III. Una reducción significativa en la prevalencia de las lesiones de pleuroneumonía a nivel de matadero después de la estabilización de la inmunidad del rebaño de reproductoras, fue observado en las mismas granjas en donde se evidenció una reducción de la mortalidad como consecuencia de la aplicación del plan de vacunación en madres.

Aún cuando la utilización de vacunas comerciales constituye una de las herramientas claves para el control de la pleuroneumonía porcina, fallas en el resultado de los planes de inmunización son frecuentemente reportadas [1, 14, 15, 16, 17].

La existencia de subpoblaciones serológicamente negativas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue más prevalente en hembras de bajas paridades: 94%, 88% y 70% para las re-

productoras de 0, 1 y 2 partos respectivamente, estos resultados contrastan con los observados para la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en donde fueron las hembras jóvenes las que presentaron los títulos más altos de anticuerpos y la mayor proporción de positividad [2].

En dos de las granjas porcinas evaluadas, treinta hembras nulíparas fueron serológicamente analizadas a los seis y nueve meses de edad. Los resultados demostraron la existencia de subpoblaciones negativas en los rebaños de madres evaluados: sólo el 10% (3/30) y el 13.3% (4/30) de las cerdas fueron seropositivas al final del estudio.

Los resultados del presente estudio que el diseño de los planes de vacunación debe considerar el resultado de los perfiles serológicos específicos para cada granja, ya que como ha

sido previamente demostrado, la vacunación de lechones en presencia de anticuerpos calostrales contra *A. pleuropneumoniae* puede producir interferencia con la inmunidad pasiva inducida por las vacunas y pudiera ser en parte la causa de los resultados contradictorios frecuentemente reportados en la utilización de productos para la prevención de esta enfermedad [6, 7].

La no vacunación de las madres permite asumir que la inmunidad calostrale transferida a sus crías, fue adquirida a partir de la infección natural de las hembras. La variabilidad en la cantidad de antígeno al cual cada animal es expuesto bajo condiciones de campo, debe traer como consecuencia una gran variación en la respuesta inmune obtenida en la población. De igual manera, cuando la infección es subclínica, el título de dicha inmunidad, debería ser inferior al obtenido mediante el suministro controlado de una dosis lo suficientemente antigénica como para generar una respuesta inmune elevada. Esto podría explicar la reducción de la mortalidad asociada a pleuroneumonía porcina después de la estabilización de la inmunidad de las madres. También podría ser la razón por la cual la duración de la inmunidad calostrale es mayor después de la aplicación de un plan de vacunación de madres.

La prueba de neutralización de actividad hemolítica en agar sangre demostró ser efectiva para la detección de inmunidad calostrale en la población bajo estudio, estos resultados coinciden con estudios previos que demuestran la utilidad de pruebas serológicas diseñadas para la detección de anticuerpos contra las citolisinas de *A. pleuropneumoniae* [11].

Estudios previos realizados en Australia [1], demostraron un efecto favorable de inmunizar a toda la población contra *A. pleuropneumoniae*, al reducir las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En el presente estudio se pudo constatar un efecto favorable de:

- 1) Estabilizar la inmunidad de las madres contra *A. pleuropneumoniae*.
- 2) El uso de perfiles serológicos para establecer la edad de vacunación.
- 3) La inmunización de los cerdos en ausencia de anticuerpos calostrales siguiendo las pautas de cada perfil serológico.

## CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio indican la existencia en granjas infectadas, de subpoblaciones de hembras negativas serológicamente a *A. pleuropneumoniae*. Por lo tanto, la estabilización de la inmunidad del plantel de reproductoras parece ser un factor clave para garantizar resultados óptimos de los programas de vacunación contra esta enfermedad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BUDDLE, JR. Whole herd vaccination for the control of pleuropneumonía. **Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress**. Bologna. Italy. 198. pp. 1996.

[2] CLARK, L.K. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Serology/vaccinology. **Proc. 30<sup>th</sup> Am Assoc Swine Practitioners**. St. Missouri. USA. 365-369. 1999.

[3] DEE, S.A.; JOO, H.S.; HENRY, S.; TOKACH, L.; PARK, B.K.; MOLITOR, T.; PIJOAN C. Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. **Swine Health and Production**. 4, 181-184.1996.

[4] DEE S.A. The porcine respiratory disease complex: Are subpopulations important? **Swine Health and Production**. 4, 147-149. 1996.

[5] DEE, S.A.; JOO, H.S.; PARK, B.K.; MOLITOR, T.W.; BRUNA G. Attempted elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock farm by vaccination of the breeding herd and nursery depopulation. **Vet Rec**. 23;142(21):569-572.1998.

[6] DEE, S.A.; JOO, H.S.; POLSON, D.D.; MARSH, W.E. Evaluation of the effects of nursery depopulation of the profitability of 34 pig farms. **Vet Rec**. 10;140(19):498-500. 1997.

[7] DEE, S.A.; JOO, H.S.; POLSON, D.D.; PARK, B.K.; PIJOAN, C.; MOLITOR, T.W.; COLLINS, J.E.; KING, V. Evaluation of the effects of nursery depopulation on the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the productivity of 34 farms. **Vet Rec**. 8140(10):247-248. 1997.

[8] DEE, S.A.; JOO, H.S.; POLSON, D.D. Improved performance of a large pig complex after sequential nursery depopulation. **Vet Rec**. 13;138(2):31. 1996.

[9] DEE, S.A.; JOO, H.S. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. **Vet Rec**. 2;135(1):6-9. 1994.

[10] DEVENISH, J.; ROSENDAL, S.; BOSSE, J.T.; WILKIE BN, JOHNSON R. Prevalence of seroreactors to the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine herds. **J Clin Microbiol**. 28(4):789-791. 1990.

[11] DEVENISH, J.; ROSENDAL, S.; JOHNSON, R.; HUBLER S. Immunoserological comparison of 104-kilodalton proteins associated with hemolysis and cytotoxicity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica*, and *Escherichia coli*. **Infect Immun**. 57(10):3210-3213. 1989.

[12] DEVENISH, J.; ROSENDAL, S. Calcium binds to and is required for biological activity of the 104-kilodalton hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Can J Microbiol**. Apr;37(4):317-321. 1991.

[13] FREY, J.; DEILLON, J.B.; GYGI, D.; NICOLET, J. Identification and partial characterization of the hemolysin

- (HlyII) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. **Vet Microbiol.** Aug 15;28(3):303-312. 1991.
- [14] FREY, J.; NICOLET, J. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca<sup>2+</sup>. **Infect Immun.** Oct;56(10):2570-2575. 1988.
- [15] GARDNER, I.A.; BOSSÉ, J.T.; SHELDRAKE, R.F.; ROSENDAL, S.; JOHNSON, R.P. Serological response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 infection in a commercial pig herd. **Aust. Vet. J.** 68:3449-3352. 1991.
- [16] MARSTELLER, T.A.; FENWICK, B. *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. **Swine Health and Production.** 4, 147-149. 1999.
- [17] RYCROFT, A.N.; WILLIAMS, D.; CULLEN, J.M.; MACDONALD J. The cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide. **J Gen Microbiol.** Mar;137 ( Pt 3):561-568. 1991.
- [18] UTRERA, V.; PIJOAN, C. A blood agar hemolysin neutralization assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* **Proc. 12<sup>th</sup> IPVS Congress.** The Hague. The Netherlands. p 218. 1992.