

รายงานผู้ป่วย

หมู่เลือด p [Tj(a-)] ในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รายงานผู้ป่วย 2 ราย ในรอบ 20 ปี

ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ, จงกล อรรคชาติ และ จินตนา พัวไพโรจน์*

ภาควิชานูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์, * คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ : หมู่เลือด p (pp) หรือ Tj(a-) เป็นหมู่เลือดในระบบ P ความถี่ของการพบหมู่เลือด p ในประชากรทั่วโลกต่ำมาก มี gene frequency <0.001 หมู่เลือด p มีความสำคัญทางคลินิก เพราะผู้ที่มีหมู่เลือด p จะสร้าง anti-PP₁P^k ซึ่งเป็น hemolytic naturally occurring antibody ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนทุกชนิดในระบบ P(P₁P₂P^k) ยกเว้น p เป็นสาเหตุของการแท้งบุตรในระยะต้นของการตั้งครรภ์ เป็นสาเหตุของ hemolytic disease of the newborn และก่อให้เกิด hemolytic transfusion reaction ที่รุนแรง

รายงานนี้ได้รายงานผู้ป่วยของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ 2 ราย ที่มีหมู่เลือด p และมี anti-PP₁P^k ในซีรัม รายแรกเป็นเด็กชายอายุ 9 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดมหาสารคาม มาโรงพยาบาลในปี 2528 ได้รับการวินิจฉัยเป็น residual poliomyelitis ซึ่งต้องรับการผ่าตัดเพื่อแก้ไขความพิการ

รายที่ 2 ตรวจพบในปี 2536 เป็นหญิงตั้งครรภ์ครั้งแรก มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดขอนแก่น อายุครรภ์ประมาณ 14 สัปดาห์ มีอาการตกเลือด จากการแท้งบุตรที่ไม่สมบูรณ์ นับเป็นรายงานแรกที่ได้รายงานการพบหมู่เลือด p(pp) ในประชากรไทย และเป็นการพบในรอบ 20 ปี (2519-2540) ของการบริการโลหิตของคลังเลือดกลาง โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Key Words : ● p blood group ● Anti-Tj^a ● Anti-PP₁P^k

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2541;8:249-54.

หมู่เลือด p เป็นหมู่เลือดที่จัดอยู่ในระบบ P ได้มีรายงานการพบหมู่เลือด p ครั้งแรกในปี 1951¹ ในสตรีชาวอเมริกัน ชื่อ Mrs. Jay ซึ่งได้ตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจน P และ P₁ จึงได้เรียกชื่อแอนติบอดีนี้อันว่า anti-Tj^a และเรียกแอนติเจนหรือหมู่เลือดของ Mrs Jay ว่า

แอนติเจน Tj(a-) ต่อมาได้เปลี่ยนมาเรียกเป็น แอนติเจน p โดยได้จัดอยู่ในหมู่เลือดระบบ P

หมู่เลือดระบบ P ถูกรายงานโดย Lansteiner และ Levine ในปี 1927 โดยฉีดเม็ดเลือดแดงของคนเข้าไปในกระต่าย และนำแอนติบอดี ซึ่งสร้างขึ้นในซีรัมของกระต่ายมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของคน ให้ปฏิกิริยาเป็นบวก และลบ จึงได้เรียกเป็นหมู่เลือด P+ และ P- ซึ่งต่อมา P+ หมายถึง P₁ และ P- หมายถึง P₂ Graham และ Williams² ได้อธิบายทฤษฎีพันธุ

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 15 กันยายน 2541 และให้ตีพิมพ์เมื่อ 30 กันยายน 2541
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ ภาควิชานูมิคุ้มกันวิทยา-
คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัด
ขอนแก่น 40002

กรรมของหมู่เลือดระบบ P ว่ามียีน 5 ชนิดอยู่บน loci 2 ชนิด ทำหน้าที่ควบคุมการถ่ายทอดแอนติเจนของระบบ P โดย locus แรกประกอบด้วย alleles 3 ชนิด คือ P^k และ P_1^k และ p ซึ่งเป็น allele ที่พบน้อยมาก ยีน P^k สร้างเอนไซม์ α -galactosyltransferase ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาล ceramide dihexoside ซึ่งเป็น precursor substance ไปเป็นแอนติเจน P^k หรือ ceramide trihexoside เท่านั้น ยีน P_1^k สร้างเอนไซม์ α -galactosyltransferase เปลี่ยน ceramide dihexoside ไปเป็นแอนติเจน P^k และเปลี่ยน paragloboside ไปเป็นแอนติเจน P_1 ในขณะที่ยีน p ไม่สร้างเอนไซม์ใดๆ เลย จึงไม่สามารถสร้างแอนติเจนใดๆ

ในส่วนของ locus ที่ 2 ประกอบด้วย ยีน 2 ชนิดคือ ยีน P_2 และยีน P_2^0 ซึ่งเป็นยีนที่พบน้อยมาก ยีน P_2 สร้าง

เอนไซม์ β -N-acetyl galactosyltransferase ทำหน้าที่เปลี่ยนแอนติเจน P^k ไปเป็นแอนติเจน P ในขณะที่ยีน P_2^0 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ใดๆ เลย (ตารางที่ 1)

ดังนั้นหมู่เลือดระบบ P จึงประกอบด้วยแอนติเจน 3 ชนิด คือ P_1 , P และ P^k ก่อให้เกิดหมู่เลือด 5 หมู่ หรือ 5 phenotypes ได้แก่ P_1 , P_2 , p , P_1^k และ P_2^k ทั้งนี้ การถ่ายทอดของแอนติเจน pp เป็นแบบ recessive⁴ (ตารางที่ 2)

หมู่เลือด p เป็นหมู่เลือดที่ไม่มีแอนติเจนใดๆ ของระบบ P (null phenotype) จึงสามารถสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนทุกชนิดของระบบ P ได้แก่ anti- P , anti- P_1 และ anti- P^k เป็นแอนติบอดีที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (naturally occurring antibody) เป็น hemolytic antibody ชนิด IgM เป็นส่วนใหญ่ และพบเป็น IgG ได้

ตารางที่ 1 P system genes and phenotypes^(2,3)

Genes				Antigens	Phenotypes
First locus	Frequency	Second locus	Frequency		
P_1^k	0.5	P_2	>0.999	P_1 , P	P_1
P^k	0.5	P_2		P	P_2
P_1^k		P_2^0	<0.001	P_1 , P^k	P_1^k
P^k		P_2^0		P^k	P_2^k
p		P_2		None	p
p	<0.001	P_2^0		None	p

ตารางที่ 2 P system phenotypes and frequencies

Phenotype	Antigen	Antibody	Frequency found in			
			Whites ⁵	Blacks ⁵	Bangkok Thais ⁶	NE.Thais ⁷
P_1	P_1 , P	None	79%	94%	27	23
P_2	P	anti- P_1	21%	6%	73	77
p	none	anti- $P+P_1+P^k$	Rare	Rare	-	-
p_1^k	P_1 , P^k	anti- P	Very rare	Very rare	-	-
p_2^k	P^k	anti- P , anti- P_1	Most rare	Most rare	-	-

ด้วย เป็นสาเหตุของ hemolytic disease of the new-born (HDN)⁸ เป็นสาเหตุสำคัญของการแท้งในระยะการตั้งครรภ์ช่วง 3 เดือนแรก⁹ และเป็นสาเหตุของ hemolytic transfusion reaction (HTR) ที่ค่อนข้างรุนแรง¹ เป็นแอนติบอดีที่จับกับ complement เมื่อทำปฏิกิริยาในหลอดทดลอง จะให้ปฏิกิริยา hemolysis ที่อุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว ฉะนั้นจึงสามารถตรวจพบหมู่เลือด p ได้จากการตรวจพบความผิดปกติในการตรวจหมู่เลือด ABO ด้วยวิธี serum grouping ทั้งนี้เพราะหมู่เลือด p ทุกสาย จะสร้าง naturally occurring hemolytic antibody มักจะให้ปฏิกิริยา hemolysis ในหลอดทดลองกับเซลล์ที่มีแอนติเจน P₁, P₂ ซึ่งเป็น common antigen ดังนั้นหากมีผู้บริจาคโลหิต หรือผู้ป่วยที่มีหมู่เลือด p ก็จะสามารถตรวจพบได้จากการทำ ABO serum grouping และการตรวจกรองแอนติบอดี รายงานนี้ได้รายงานการตรวจพบหมู่เลือด p 2 ราย ที่พบในผู้ป่วยของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ในรอบ 20 ปี เป็นรายงานแรกของการพบหมู่เลือด p ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและในประเทศไทย

รายงานผู้ป่วยรายที่ 1

เด็กชายอายุ 9 ขวบ มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดมหาสารคาม บิดาพามาโรงพยาบาลด้วยอาการสำคัญคือ เดินไม่ได้มา 7 ปี รูปร่างผอม น้ำหนัก 18 กิโลกรัม กล้ามเนื้อขาทั้งสองข้าง ข้อมือและสะโพกงอเหยียดตรงไม่ได้ มีประวัติป่วยเป็นไข้เมื่อ 7 ปีก่อน หลังจากนั้นมีอาการกล้ามเนื้อลีบเดินไม่ได้ เคยพาไปโรงพยาบาล แพทย์วินิจฉัยว่า

เป็นโรคโปลิโอ แนะนำให้รักษาทางกายภาพบำบัด แต่บิดามีได้พาไปรักษาจนกระทั่งอายุได้ 9 ปี จึงได้พามาโรงพยาบาลในครั้งนี้ แพทย์ได้วินิจฉัยโรคเป็น residual poliomyelitis แนะนำให้ผ่าตัดเพื่อแก้ไขความพิการ และได้ขอเลือดเตรียมผ่าตัด 1 ยูนิต

รายงานผู้ป่วยรายที่ 2

ผู้ป่วยหญิงอายุ 24 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดขอนแก่น ตั้งครรภ์ครั้งแรก อายุครรภ์ประมาณ 14 สัปดาห์ มาโรงพยาบาลด้วยอาการตกเลือด ได้รับการวินิจฉัยโรคเป็น incomplete abortion แพทย์ได้ขอเลือดเพื่อการรักษา 1 ยูนิต

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. ผลการตรวจ ABO grouping (ตารางที่ 3)
2. ผลการตรวจกรองและตรวจหาชนิดของแอนติบอดี รายที่ 1 และรายที่ 2 ให้ผล complete hemolysis กับ screening cells และ panel cells ทุกสายที่อุณหภูมิห้องภายในเวลา 5 นาที ในขณะที่ auto control ให้ผลลบทั้งสองสาย
3. ผลการตรวจเพิ่มเติม (ตารางที่ 4)
4. ผลการตรวจหมู่เลือดของบิดามารดา

ผู้ป่วยรายที่ 1 บิดาหมู่เลือด O, P₁ มารดาหมู่เลือด B, P₂
 ผู้ป่วยรายที่ 2 ไม่ได้ตรวจ

สรุปผลการตรวจ

ผู้ป่วยทั้ง 2 ราย มีหมู่เลือด p(pp) หรือ Tj(a-) และมี anti-PP₁P₂^k (anti-Tj^a) ในซีรัม

ตารางที่ 3 ผลการตรวจ ABO grouping

	Cell grouping			ABO	Serum grouping		
	anti-A	anti-B	anti-A,B		A cells	B cells	O cells
ผู้ป่วยรายที่ 1	neg	4+	4+	B	PH	PH	PH
ผู้ป่วยรายที่ 2	neg	neg	neg	O	H	H	H

PH = partial hemolysis; H = complete hemolysis; neg = negative

ตารางที่ 4 ผลการตรวจเพิ่มเติม

	Patient red cells with			
	anti-H	anti-P ₁	anti-Tj ^a (PP ₁ P ^k)	autocontrol
ผู้ป่วยรายที่ 1	4+	neg	neg	neg
ผู้ป่วยรายที่ 2	4+	neg	neg	neg

วิจารณ์

P₁ และ P₂ เป็นหมู่เลือดที่พบทั่วไปในประชากรทั่วโลก ในขณะที่พบหมู่เลือด p ได้น้อยมาก Race และ Sanger ได้คำนวณความถี่ของหมู่เลือด p ในประชากรทั่วโลก ว่าพบประมาณ 5.8 ต่อ 1 ล้านคน⁴ โดยพบได้มากที่สุดในการที่อยู่ที่อยู่ในบริเวณ Vasterbotton ซึ่งอยู่ตอนเหนือของประเทศสวีเดน และพบได้บ้างในชาวญี่ปุ่น⁹ นอกจากนี้ยังพบในชาวอิสราเอลด้วยความถี่ที่สูงกว่าชาติอื่น แต่ต่ำกว่าที่พบในชาวสวีเดนและญี่ปุ่น¹⁰ รายงานนี้ได้รายงานการพบหมู่เลือด p หรือ pp หรือ Tj(a-) ในคนไทยเป็นครั้งแรก โดยรายแรกตรวจพบในปี 25^{๖8} ในเด็กชายอายุ 9 ขวบ ซึ่งมีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดมหาสารคาม บิดา และมารดา มีหมู่เลือดเป็น P₁ และ P₂ ฉะนั้นบิดาและมารดาจึงควรมียีนโนไทป์ เป็น P₁p และ P₂p ตามลำดับ บุตรชายจึงได้รับการถ่ายทอดแอนติเจน p มาจากทั้งบิดาและมารดาเป็น homozygous p (pp) คลั่งเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ ไม่สามารถหาเลือดจากคนไทยสำหรับเตรียมผ่าตัดได้ จึงได้ขอความช่วยเหลือจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ติดต่อหาเลือดให้ และได้รับ packed red cell หมู่ O, pp จากสภากาชาดญี่ปุ่น ผู้ป่วยจึงได้รับการผ่าตัดแก้ไขความพิการ แต่ในท้ายที่สุดด้วยความสามารถของแพทย์ผู้ทำการผ่าตัด ปรากฏว่าไม่ต้องให้เลือดในผู้ป่วยรายนี้ อนึ่ง เป็นที่น่าเสียดายที่มีได้มีการติดตามศึกษาหมู่เลือด p ในครอบครัวและเครือญาติของผู้ป่วยรายนี้ จึงไม่ทราบว่ามีผู้ใดในครอบครัวที่มีหมู่เลือด p เช่นเดียวกับผู้ป่วยอีกบ้าง

ผู้ป่วยหมู่เลือด p(pp) รายที่ 2 เป็นหญิงมีครรภ์ ชาวจังหวัดขอนแก่น มาตรวจที่แผนกอุบัติเหตุฉุกเฉิน โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ในปี 2536 เนื่องจากตกเลือดซึ่งเป็นอาการของการแท้งบุตรที่ยังไม่สมบูรณ์ แต่ผู้ป่วยสุขภาพค่อนข้างแข็งแรง ไม่มีอาการซีด (hematocrit 40%) จึงไม่จำเป็นต้องให้เลือด และผู้ป่วยกลับบ้านหลังจากพักรักษาอยู่ในโรงพยาบาลเพียง 1 คืน และไม่กลับมารับการตรวจรักษาเพิ่มเติมอีกเลย สรุปได้ว่า anti-PP₁P^k ที่พบในผู้ป่วย pp รายนี้ น่าจะเป็นสาเหตุของการแท้งบุตรในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งครรภ์ เช่นเดียวกับที่มีรายงานมาแล้วในประชากรชาติอื่น^{8,10,11,12} anti PP₁P^k สามารถทำให้เกิด HDN และการแท้งบุตรได้ เพราะแอนติบอดีดังกล่าวประกอบไปด้วย IgM และ IgG เช่นเดียวกับแอนติบอดีในระบบ ABO ที่พบในคนหมู่ O¹³ ได้มีการศึกษาพบว่า anti-PP₁P^k ที่พบในหญิงมีครรภ์หมู่ pp จะแสดง cytotoxic effect ต่อทารกในครรภ์ที่มีหมู่ P₁p มากกว่าทารกหมู่ P₂p ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ anti-P₁ ที่สร้างขึ้นมามีไโตเตอร์สูง¹² จึงมีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์ P₁p ได้สูงด้วย ก่อให้เกิดการแท้งบุตรในระยะต้นของการตั้งครรภ์

จะเห็นได้ว่าถึงแม้มีโอกาสพบหมู่เลือด pp ได้น้อยมากในประเทศไทย แต่ก็สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 ราย ในช่วงระยะเวลาห่างกัน 8 ปี และเป็นารพบในระยะเวลา 21 ปี นับตั้งแต่ได้เปิดบริการคลังเลือดในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่ 2519 ถึง 2540 ซึ่งได้ทำการตรวจหมู่เลือด ABO วิธี cell group-

ing ร่วมกับ serum grouping และตรวจกรองแอนติบอดีในผู้ป่วยที่ขอเลือดและผู้ป่วยโรคโลหิตจาง ซึ่งจากการตรวจดังกล่าว จะสามารถตรวจพบ anti-PP₁P^k ได้อย่างแน่นอน นำไปสู่การพบหมู่เลือด p(pp) ซึ่งจะสร้าง anti-PP₁P^k เสมอ คณะผู้รายงานคาดหวังว่า หากได้ทำการติดตามศึกษาตัวอย่างเลือดจากครอบครัวและเครือญาติของผู้ป่วยทั้ง 2 รายแล้ว น่าจะพบหมู่เลือด p เพิ่มขึ้น

หมู่เลือด p มีความสำคัญทางคลินิกซึ่งเป็นสาเหตุของ HDN การแท้งบุตรในระยะต้นของการตั้งครรภ์ และ HTR ดังนั้นผู้ที่มีหมู่เลือด p จึงมีความเสี่ยงอย่างยิ่ง หากจำเป็นต้องรับการรักษาด้วยการให้เลือดในกรณีฉุกเฉิน เพราะต้องได้รับเลือดจากหมู่เลือด p เดียวกัน ซึ่งมีความถี่ต่ำมากๆ อาจหาได้ในครอบครัวเดียวกัน แต่มีโอกาสน้อยมาก และต้องใช้เวลา การขอเลือดจากชาติอื่น เช่น ญี่ปุ่น หรือสวีเดน จะมีโอกาสได้สูงกว่า แต่ใช้เวลาพอสมควร ซึ่งจะทำให้ในกรณีหรือได้เท่านั้น ฉะนั้นหากมีโอกาสตรวจพบหมู่เลือด p ในผู้ป่วยหรือผู้ป่วยโรคโลหิต จึงควรติดตามศึกษาครอบครัวและเครือญาติ ซึ่งอาจจะพบหมู่เลือด p เพื่อที่จะติดตามได้ในกรณีที่มีความจำเป็นต้องใช้เลือดสำหรับผู้ป่วยหมู่ p เดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ขอเลือด pp จากสภากาชาดญี่ปุ่น สำหรับใช้เตรียมผ่าตัดผู้ป่วยรายแรก

ขอขอบคุณ Dr.Makoto Uchikawa, Ph.D. Central Blood Centre, Japanese Red Cross Society, Tokyo, Japan ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ known anti-Tj^a

เอกสารอ้างอิง

1. Levine P, Bobbitt OB, Waller RK, Kuhmichel A. Isoimmunization by a new blood factor in tumor cells. Proc Soc Exp Biol 1951;77:403-5.
2. Graham HA, Williams AN. A genetic model for the inheritance of the P, P₁ and P^k antigens (abstract). Transfusion 1978;18:638-9.
3. Wilkinson SL. The Lewis, secretor and soluble ABH antigens : The I and P blood group systems. In : Rudmann SV, ed. Textbook of blood banking and transfusion medicine. Philadelphia : WB. Saunders Company, 1995:92-5.
4. Race RR, Sanger R. Blood group in man. 6th ed. London : Blackwell Scientific Publications, 1975:154.
5. Calhoun L. Other major blood group systems. In : Harmening DM, ed. Modern blood banking and transfusion practices. 3rd ed. Philadelphia : F.A. Davis company. 1994:159.
6. Chandanayingyong D, Sasaki TT, Greenwalt TJ. Blood groups of the Thais. Transfusion 1967;7:269-76.
7. ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. การกระจายของหมู่เลือดในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รายงานการวิจัย 2522.
8. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 9th ed. London : Blackwell Scientific Publications, 1993:190.
9. Race RR, Sanger R. Blood group in man. 6th ed. London : Blackwell Scientific Publications, 1975:150-3.
10. Levene C, Sela R, Rudolphson Y, Nathan I, Karplus M, Dvilansky A. Hemolytic disease of the newborn due to anti-PP₁P^k (anti-Tj^a). Transfusion 1977;17:569-72.
11. Weiss DB, Levene C, Aboulafia Y. Isaacsohn M. Anti-PP₁P^k (anti-Tj^a) and habitual abortion. Fertil Steril 1975;26:901-3.
12. Levine P. Comments on hemolytic disease of the newborn due to Anti-PP₁P^k (anti-Tj^a). Transfusion 1977;17:573-8.
13. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine. 9th ed. London : Blackwell Scientific Publications, 1993:191.

Rare Blood Group p [Tj(a-)] Among the Northeastern-Thai Population : A Report of Two Cases Over 20 Years

Yupa Urwijitaroon, Jongkol Akahat* and Chintana Puapairoj*

Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences

* Blood Transfusion Centre, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Abstract : Blood group p (pp) or Tj(a-) is a very rare blood type which belongs to the P system. The frequency of p blood group is very rare. The gene frequency of p is <0.001. The p blood group is most clinically significant, since the serum of p individual contains naturally occurring hemolytic anti-PP₁P^{*}, which induces spontaneous abortions during early pregnancy, hemolytic disease of the newborn, and severe hemolytic transfusion reactions.

We report two cases of the p blood group with anti-PP₁P^{*} found among the northeastern-Thai population. The first case was found in 1985 in a nine year old boy suffering with residual poliomyelitis. The second patient was found in 1993 in a 24 year old first time pregnant woman, who had bleeding due to an incomplete abortion.

This report is the first report of p (pp) blood type among the Thai population, which was found over 20 years (1976-1997) of service at the Blood Transfusion Centre, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

Key Words : ● p blood group ● Anti-Tj^a ● Anti-PP₁P^{*}

Thai J Hematol Transf Med 1998;8:249-54.