

REPRODUÇÃO DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS COM PEQUENO NÚMERO DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*¹

JEROME LANGENEGGER² e CHARLOTTE HUBINGER LANGENEGGER²

ABSTRACT. Langenegger J. & Langenegger C.H. 1988. [Reproduction of caseous lymphadenitis in goats by small numbers of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.] Reprodução da linfadenite caseosa em caprinos com pequeno número de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 8(1/2):23-26. Embrapa-UAPNPSA, 23851 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.

Caseous lymphadenitis was reproduced experimentally by intradermic inoculation of 5, 20 and 100 washed *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacteria in 26 normal goats. Between day 2 and 9 after inoculation, there was local erythema, papula and skin ulceration and, at day 15, a small enlargement of the local lymph node. Between day 45 and 180, independent of the infective dose rate, the infection developed to an abscess in the local lymph node of about one third of the goats. A similar number showed a pronounced enlargement of the local lymph node, but these later became normal again. The remainder of the goats showed an early return to normal after the initial signs of infection. All 26 goats, except 2, presented an antitoxin titre during some phase of the infection. The experimental infection was shown to develop as the natural. It was concluded that selfcures, demonstrated experimentally, must also occur in the field, making clinical and immunological diagnosis difficult.

INDEX TERMS: Caseous Lymphadenitis, experimental infection, goats, pathogenesis.

SINOPSE. - A linfadenite caseosa foi reproduzida experimentalmente através da inoculação intradérmica de 5, 20 e 100 bactérias lavadas de *C. pseudotuberculosis* em 26 caprinos normais. A infecção manifestou-se, inicialmente, por formação de eritema, pápula, pústula e ulceração local da pele entre o 2º e o 9º dia pós-inoculação e no 15º dia por um ligeiro aumento do linfonodo satélite. Posteriormente, entre o 45º e o 180º dia, independentemente da dose infectante usada, a infecção evoluiu para abscedação do linfonodo local em cerca de 1/3 dos caprinos. Em outro número similar, observou-se acentuado aumento do volume do linfonodo mas que depois regrediu e, finalmente, nos restantes houve rápida normalização após os sinais iniciais da infecção. Dos 26 caprinos apenas 2 não apresentaram antitoxinas no soro durante nenhuma fase da infecção. Foi demonstrado com o presente experimento que a infecção evoluiu simulando a natural e concluiu-se que as curas espontâneas observadas também devem ocorrer nas infecções de campo, dificultando o diagnóstico clínico e imunológico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Linfadenite caseosa, infecção experimental, caprinos, patogenia.

INTRODUÇÃO

Relativamente pouco se conhecia sobre a patogenia da linfadenite caseosa dos ovinos e caprinos no que se refere à fase pre-clínica da infecção. Após o reconhecimento do agente etiológico, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por Nocard (1889) e Preisz (1894), foi aceita, por longo tempo, que a principal via de infecção no ovino seriam as feridas acidentais causadas pela tosquia e corte da cauda

(Carne 1932, Bull & Dickinson 1935). As tentativas de reproduzir a doença em ovinos e caprinos através da inoculação de culturas, por via subcutânea, davam resultados muito diferentes comparados com a infecção natural. Doses maiores causavam quadros clínicos aberrantes (Abdel-Hamid 1973) e doses menores não reproduziam o quadro clínico da doença com regularidade, o que dificultava esclarecer aspectos da patogênese e da epizootiologia da linfadenite caseosa.

Nas duas últimas décadas foram testadas várias maneiras de reproduzir a linfadenite caseosa. Partindo do pressuposto de que a infecção por *C. pseudotuberculosis* em caprinos na região seca do nordeste do Brasil fosse ocasionada via ferimentos da pele causado por espinhos de cactáceas existentes nas pastagens, Costa Filho et al. (1967) reproduziram a doença escarificando e perfurando a pele de 14 caprinos com espinhos e colocando sobre a área ferida o pús de abscessos causados por *C. pseudotuberculosis*. A partir do 3º mês pós-infecção os animais começaram a apresentar abscessos nos pontos de inoculação e posteriormente formando cadeias nos vasos e linfonodos, inclusive com lesões nos órgãos internos. Não fora feita monitoração sorológica ou alérgica.

Movido pela necessidade de dispor de um modelo experimental que reproduzisse regularmente a linfadenite caseosa em ovinos visando o teste de vacinas contra a doença, Cameron et al. (1972) utilizaram-se da inoculação intravenosa. Esta via de infecção permitiu obter abscessos múltiplos nos pulmões com certa regularidade, o que foi comprovado por Brogden et al. (1984).

A possível predisposição dos banhos sarnicidas na in-

¹ Aceito para publicação em 17 de agosto de 1987.

² Embrapa - Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851.

fecção dos ovinos por *C. pseudotuberculosis*, levou Nairn & Robertson (1974) a descoberta de que a infecção pode estabelecer-se através da pele intacta e cuja evolução muito se assemelhava a infecção natural. Os autores comprovaram a presença de antitoxinas pelo teste de inibição da antihemolisina descrita por Zaki (1968).

Nagy (1976) procurou explorar outras prováveis vias de infecção, inoculando cultura de *C. pseudotuberculosis* em 30 ovinos por via vaginal, prepucial, oral, intratraqueal, subcutânea e através de ferimentos (cortes) na pele. Verificou na necropsia que, pelo número de abscessos encontrados nos linfonodos, a via mais afetiva foi a dos ferimentos da pele (26 abscessos), seguida da subcutânea (12), vaginal (9), intratraqueal (7), oral (2) e prepucial (0). Fez controles clínicos apenas no 5º, no 35º e no 122º dia após-infecção, sem testes sorológicos.

Husband & Watson (1977) e Burrell (1978) desenvolveram um modelo experimental de infecção do *C. pseudotuberculosis* via o vaso linfático aferente do linfonodo poplíteo, que permitiu reproduzir a doença com certa regularidade. Usaram esta via de infecção por simular a infecção natural para estudar aspectos imunológicos e histopatológicos iniciais da infecção.

Ashfag & Campbell (1980) e Campbell et al. (1982) induziram a linfadenite caseosa em 14 caprinos inoculando, simultaneamente, 1×10^6 *C. pseudotuberculosis* de cultura lavada pelas vias subcutânea, intradérmica e submucosa. Durante os primeiros 3 dias os animais mostraram-se abatidos com o dorso arqueado e pêlos arrepiados. Nos pontos de inoculação manifestaram-se reações inflamatórias que desapareceram 4 a 5 dias após. Em todos os caprinos desenvolveram-se abscessos em vasos e linfonodos satélites e, em apenas 1, foram encontradas lesões nos pulmões. O período de incubação até o aparecimento de abscesso palpáveis variou de 41 a 147 dias com média de 95,2 dias e o período de eliminação do germe através da abertura cirúrgica de 20 abscessos variou de 9 a 37 dias com média de 20,3 dias. Não foi feita monitoração sorológica das infecções.

Brown et al. (1985, 1986) fizeram a reprodução experimental da linfadenite caseosa em três grupos de 5 caprinos indenes pela inoculação intradérmica com doses de $0,25 \times 10^6$, $0,50 \times 10^6$ e $4,2 \times 10^6$ de bactérias lavadas de *C. pseudotuberculosis*, na fossa lombar. Todos os animais revelaram febre transitória nas primeiras 24 horas e acentuada reação inflamatória nos pontos de inoculação no 3º dia. No final da 1ª semana houve ulceração da pele e exsudação de material purulento. Na maioria dos animais apareceram múltiplos abscessos localizados no ponto de inoculação, nos linfonodos, como também em órgãos internos, visto na necropsia feita aos 127 dias pós-infecção. Houve monitoração sorológica e alérgica.

Considerando que a reprodução experimental da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos vinha sendo feita por vias estranhas ou com doses inoculantes muito grandes de *C. pseudotuberculosis*, dificilmente viáveis na natureza, julgou-se oportuno induzir infecções com pequeno número de bactérias, por inoculação intradérmica para acompanhar a evolução da doença em condições que se assemelhassem mais às da infecção natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram usados 26 caprinos com 4 e 6 meses de idade e também

alguns animais adultos, procedentes de criações livres da linfadenite caseosa. Durante a experimentação, os caprinos foram mantidos em grupos, em abrigos isolados com acesso a piquetes e recebiam suplementação de forragem verde e ração concentrada.

Antes da infecção experimental, todos os animais foram submetidos ao teste de inibição da hemólise sinérgica (Knight 1978) e à prova alérgica cutânea (Langenegger et al. 1987a,b) para assegurar a ausência da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A infecção foi realizada na pele do flanco na região prefemural após depilação de área com cerca de 6x6 cm de lado, por injeção intradérmica da suspensão bacteriana na dose de 0,1 ml. O inóculo consistiu da suspensão em salina de *C. pseudotuberculosis*, amostra 303, isolada por abscesso de caprino, mantida em meio de soro de Loeffler e periodicamente passada em cobaios. Partindo da cultura em meio de Caldo de Soja Tríplice (TSB), incubada a 37°C durante 24 hs, a massa bacteriana foi lavada duas vezes em salina, suspensa em volume igual ao anterior da cultura e diluída até 10^{-6} . Nesta última, eram encontrados ao redor de 100 unidades formadoras de colônias (CFU) em 0,1 ml. A partir desta, por diluições proporcionais, foram obtidos os inóculos com 20 e 5 unidades. Três grupos de caprinos com 5, 8 e 13 animais foram infectados respectivamente com 5, 20 e 100 CFUs de *C. pseudotuberculosis*. A presença e o número de bactérias viáveis inoculadas nos caprinos de cada grupo foi assegurada pela infecção, imediatamente após, de 2 cobaios e pela semeadura em duas placas de agar-sangue, da mesma dose do inóculo usado na infecção dos caprinos.

As infecções experimentais, foram monitoradas, inicialmente, por inspeção diária dos animais com especial atenção sobre o estado geral de saúde, o ponto de inoculação e a palpitação comparativa dos linfonodos precurais opostos. Da 3ª à 6ª semana pós-infecção foram feitos controles semanais e posteriormente de 3 em 3 semanas até o final do 6º mês. Foram registradas alterações que se sucederam no ponto de inoculação, o aumento do volume do linfonodo satélite, a resposta imunológica humoral através da prova SHI e da linfadenização.

No final do período experimental, a presença ou ausência da infecção e de lesão nos linfonodos e vísceras foi confirmada por exames necroscópicos e bacteriológicos.

RESULTADOS

A inoculação experimental intradérmica de 5, 20 e 100 CFU de *Corynebacterium pseudotuberculosis* revelou as seguintes alterações durante a evolução da infecção por 180 dias:

a) *Sinais clínicos*. Nenhum dos 26 caprinos revelou febre ou qualquer distúrbio no estado geral de saúde nas primeiras duas semanas pós-infecção.

b) *Lesões no ponto de inoculação*. A inspeção do local da inoculação mostrou nítido eritema nos animais de pele branca que se concentrou entre o 1º e o 3º dia após a infecção, a formação de pápula entre o 3º e o 5º dia e a transformação desta em pústula entre o 5º e o 7º dia, ulcerando em seguida. O tamanho da úlcera na pele variou entre 2 e 5 mm de diâmetro, sendo em geral maiores as mais precoces. Em torno do 12º e 14º dia completava-se a cicatrização da ulceração, geralmente precidida por uma crosta seca.

c) *Reação do linfonodo*. Ao final da 2ª semana pós-infecção, a palpitação dos linfonodos precurais satélites do local da inoculação evidenciava um pequeno aumento de volume (+) em relação ao linfonodo oposto em todos os animais. Nos controles seguintes, aos 42, 84, 126 e 168 dias, a evolução da infecção revelou que cerca de 1/3 dos animais o linfonodo precural continuou aumen-

Quadro 1. Evolução da infecção experimental com 5, 20 e 100 bactérias viáveis de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos

Nº de ordem	Caprino nº	Nº bact. inoc.	Lesões da pele					Alterações dos linfonodos						Exames				
			1 ^(a)	3	5	7	9	14	42	84	126	168	180 ^(b)	Bact.	Sorol.	Alerg.		
01	001	5		e ^(c)	pa				-(d)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2
02	004	5	e	pa		pu	ulc	+	±	±	±	-	-	-	-	1/160		4,8
03	006	5		e	pa			-	-	-	-	-	-	-	-	1/20		2,0
04	010	5	e	pa	pu	ulc		+	++	+++	abs		+	+	+	1/80		7,9
05	396	5	e	pa	pu	ulc		+	++	+++	abs	ulc	-	-	-	1/160		9,0
06	003	20	e	pa	pu	ulc		+	++	+++	abs		+	+	+	1/40		8,0
07	007	20		e	pa		n	-	-	-	-	-	-	-	-	1/20		3,0
08	367	20	e	pa	pu	ulc		+	+	++	++	+	-	-	-	1/40		4,0
09	369	20	e	pa	pu	ulc		+	±	±	±	±	-	-	-	1/80		6,0
10	370	20	e	pa	pu	ulc		+	+++	abs			+	+	+	1/80		7,3
11	371	20		e	pa	pu	ulc	±	-	-	-	-	-	-	-	1/20		2,0
12	385	20	e	pa	pu	ulc		+	±	-	+	+	-	-	-	1/160		10,0
13	388	20		e	pa	pu	ulc	+	±	±	±	-	-	-	-	1/40		6,0
14	021	100	e	pa	ulc			+	++	++	abs		+	+	+	1/320		7,0
15	022	100	e	pa	pu	ulc		+	+++	+	-	-	-	-	-	1/160		2,8
16	023	100	e	pa	pu	ulc		+	+	-	-	-	-	-	-	1/160		3,2
17	025	100		e	pa	pu	ulc	+	+	++	+++	abs	+	+	+	1/160		4,0
18	026	100		e	pa	pu	ulc	+	++	-	-	-	-	-	-	1/80		9,6
19	027	100	e	pa	pu	ulc		+	++	-	-	-	-	-	-	1/320		2,6
20	028	100	e	e		pa	n	+	-	-	-	-	-	-	-	-		0,7
21	029	100		e	pa	pu	ulc	+	++	-	-	-	-	-	-	1/20		2,5
22	030	100		e	pa	pu	ulc	+	+	-	-	abs	+	+	+	1/160		4,1
23	031	100	e	pa	pu	ulc		+	+++	+	-	-	-	-	-	1/1280		6,0
24	OCP	100	e	pa	pu	ulc		+	+++	+	-	-	-	-	-	1/1280		
25	OCB	100	e	pa	pu	ulc		+	-	-	-	-	-	-	-	1/40		
26	366	100	e	pa	pu	ulc		+	+++	abs			+	+	+	1/20		5,3

(a) Dias após a infecção;

(b) Achados à necropsia;

(c) e = eritema, pa = pápula, pu = pústula, ulc = úlcera, n = normal, abs = abscesso;

(d) - = não aumentado, + = aumento discreto (\pm 25% maior que o oposto), ++ = aumento médio (\pm 50% maior que o oposto), +++ = aumento acentuado (o dobro ou mais).

tando progressivamente de volume (++, +++) e em torno do 126º dia passou a apresentar deformação que caracterizava um abscesso palpável. Em outro terço dos animais também houve acentuado aumento de volume do linfonodo precural (++, ++++), mas a partir do 84º dia de observação ocorria lenta regressão do tamanho dos linfonodos que aos 180 dias eram aparentemente normais. Dos animais restantes alguns mantinham um ligeiro aumento do volume (+) do linfonodo até o 42º dia, mas logo depois todos voltavam ao tamanho normal permanecendo até o 180º dia. O Quadro 1, resume o comportamento individual de cada animal e sintetiza a tendência da evolução da infecção, nos dias 14, 42, 84, 126 e 168 após a infecção.

d) *Outras alterações patológicas.* A inoculação experimental com pequeno número de bactérias não causou o aparecimento de abscedações na pele, no ponto de inoculação ou ao longo de vasos linfáticos. Nos linfonodos, limitou-se apenas nos satélites do local da inoculação, excetuando-se um caso em que abscedou o linfonodo submandibular. Não foi registrado nenhum caso de lesões internas. Em todos os abscessos foi confirmada a presença de *C. pseudotuberculosis* bacteriológicamente.

e) *Reação imunológica.* A infecção experimental foi comprovada pela presença de antitoxinas, exceto em dois animais, reveladas pelo método da inibição da hemólise sinérgica, variando títulos de 0 a 1/1280. No Quadro 1 estão registrados os maiores títulos encontrados em uma

fase da evolução da infecção. Paralelamente, a infecção também foi testemunhada pela sensibilidade alérgica através da linfadenização acusando reações positivas em 24 animais e reação considerada negativa em 2 conforme ilustra o Quadro 1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na presente pesquisa foi reproduzida experimentalmente a linfadenite caseosa em caprinos através da inoculação intradérmica de apenas 5, 20 e 100 bactérias lavadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, comportando-se a evolução da infecção muito semelhantemente ao que se observa na doença a campo. O resultado é parecido ao de Nairn & Robertson (1974) que demonstraram ser possível a instalação da infecção através da pele íntegra. Embora os autores tenham usado uma cultura de *C. pseudotuberculosis* com 10^8 CFU e assim colocado grande número de bactérias sobre o pelo do animal, o número de germes invasores, presumivelmente, tenha sido pequeno a julgar pela reduzida proporção de lesões que se transformaram em "crateras" com evolução semelhanté ao das pápulas, pústulas e úlceras assinaladas na presente pesquisa, e posteriormente a abscedação dos linfonodos satélites. As infecções em condições naturais, certamente, são favorecidas quando há soluções de continuidade da pele como pôde demonstrar Costa Filho et al. (1967) e Nagy (1976), mas apesar disso, o número de bactérias fagocitadas deve

ser reduzido pois na grande maioria a evolução da infecção transcorre sem comprometimento agudo da saúde do animal, mas tão somente com a manifestação tardia de lesões supurativas de um ou mais linfonodos. Ao contrário, quando as infecções experimentais são feitas com grande número de bactérias e, ainda se o inóculo contiver toxinas da cultura, a evolução da linfadenite caseosa se torna atípica como foi verificado nas infecções subcutâneas (Abdel-Hamid 1973), endovenosa (Cameron 1972, Brogden et al. 1984), linfática (Husband & Watson 1977, Burrell 1978) e mesmo na via intradérmica e intramucosa (Ashfag & Campbell 1980, Campbell et al. 1982, Brown et al. 1985, 1986) com doses na ordem de 10^6 CFU.

A presente pesquisa revelou aspectos inéditos no que se refere ao comportamento da evolução da infecção pois, aparentemente, não houve diferença acentuada entre os grupos de caprinos infectados com 5, 20 e 100 bactérias como mostram os sinais iniciais das lesões da pele traduzidos pelo eritema, pápula, pústula e úlcera e pelo pequeno aumento de volume do linfonodo satélite nas duas semanas pós-infecção. Posteriormente, também independentemente da dose de bactérias infectantes, a infecção evoluiu para três patamares distintos pois em cerca de 1/3 dos animais houve abscedação do linfonodo precural, em outro número semelhante houve nítido aumento de volume do linfonodo local até o 84º dia pós-infecção; este depois regrediu para o normal e finalmente o grupo restante que, após os sinais iniciais da infecção, também voltou ao normal. Dos 26 caprinos infectados apenas 2 não apresentaram antitoxinas e sensibilidade alérgica em uma fase da infecção, detectáveis com os testes usados.

O resultado desta pesquisa permitiu concluir que, à exemplo das autocuras observadas nestas infecções experimentais, precedidas por lesões locais da pele, reação ganglionar e resposta imunológica, o mesmo deve ocorrer nas infecções à campo. Este achado esclarece que as autocuras nas infecções à campo por *C. pseudotuberculosis* dificultam o diagnóstico clínico e tornam inespecíficas as provas sorológicas e alérgica do diagnóstico imunológico precoce da linfadenite caseosa, se a especificidade do teste for baseada na ocorrência de lesões supurativas.

Agradecimentos.- Os autores agradecem o apoio financeiro da FINEP que permitiu complementar a infraestrutura laboratorial e de campo para o desenvolvimento da presente pesquisa, bem como a valiosa assistência do Técnico de Laboratório Orlandino José Gregório e dos Laboratoristas José Enéas Barbosa e Marildo de Azevedo.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Hamid Y.N. 1973. A clinical investigation on the manifestation of goats to experimental infection with *C. ovis*. J. Egyptian Vet. Med. Ass. 33:45-53.
- Ashfag M.K. & Campbell S.G. 1980. Experimentally induced caseous lymphadenitis in goats. Amer. J. Vet. Res. 41:1789-1792.
- Brogden K.A., Cutlip R.C. & Lehmkuhl H.D. 1984. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. Am. J. Vet. Res. 45:1532-1534.
- Brown C.C., Olander H.J., Biberstein E.L. & Moreno D. 1985. Serologic response and lesions produced in goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of caprine and equine origin. Am. J. Vet. Res. 46:2322-2326.
- Brown C.C., Olander H.J., Biberstein E.L. & Morse S.M. 1986. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 47:1116-1119.
- Burrell D.H. 1978. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. Res. Vet. Sci. 24:269-276.
- Cameron C.M., Minnaar J.L., Engelbrecht M.M. & Purdon M.R. 1972. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. Onderstepoort J. Vet. Res. 39:11-24.
- Campbell S.G., Ashfag M.K. & Tashjian J.J. 1982. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. Proc. Annu. Meet. Goat Prod. Dis. 3:449-454.
- Carne H.R. 1932. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. Aust. Vet. J. 8:42-47.
- Costa Filho G.A., Magalhães M., Barreto S.C.P., Fraga I.S. & Duarte C.F. 1967. Improvisação da inoculação natural para verificação do poder imunogênico da vacina contra a linfadenite caseosa dos caprinos do Instituto Biológico da Bahia. Bolm Téc. n° 29, Inst. Pesq. Agron., Recife, Brasil.
- Husband A.J. & Watson D.L. 1977. Immunological events in the popliteal lymph node of sheep following infection of live or killed *Corynebacterium ovis* into an afferent popliteal lymphatic duct. Res. Vet. Sci. 22:105-112.
- Knight H.D. 1978. A serologic method for the detection of *C. pseudotuberculosis* infections in horses. Cornell Vet. 68: 220-237.
- Langenegger C.H., Langenegger J. & Costa S.G. 1978a. Allergen for the diagnosis of caseous lymphadenitis in goats. Proc. IV Int. Conf. on Goats, Brasília, 2:1347-1348. (Abstract)
- Langenegger C.H., Langenegger J. & Costa S.G. 1978b. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 7(2):1987.
- Nagy G. 1976. Caseous lymphadenitis in sheep: methods of infections. J. S. Afr. Vet. Assoc. 47:197-199.
- Nairn M.E. & Robertson J.P. 1974. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. Aust. Vet. J. 50:537-542.
- Nocard, 1889. (Cited by Wilson and Miles 1955)
- Preisz, 1984. (Cited by Wilson and Miles 1955)
- Wilson G.S. & Miles A.A. 1955. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Vol. 1, 4th ed. Edward Arnold, London.
- Zaki M.M. 1968. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. Res. Vet. Sci. 9:489-493.