

TRABAJOS CIENTÍFICOS

Descripción de genotipos de *Echinococcus granulosus* obtenidos de especímenes de hidatidosis humana*

Echinococcus granulosus genotypes in samples of human hydatidosis

Drs. CARLOS MANTEROLA^{1,2}, ANGÉLICA MELO³, MANUEL VIAL^{1,2}, JUAN CARLOS ROA³, JAVIER MORA³

¹Departamento de Cirugía. ²CIGES (Capacitación, Investigación y Gestión para la salud basada en evidencia).

³Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Temuco, Chile

RESUMEN

Introducción: Se ha descrito variabilidad ambiental de *Echinococcus granulosus* (Eg). Se han reportado 10 genotipos y cierta heterogeneidad intergenotipo en estudios con material proveniente de animales. El objetivo de este estudio es describir los resultados de un protocolo de genotipificación de Eg en muestras de hidatidosis humana. **Material y método:** Estudio de corte transversal. Se recolectó el líquido hidatídico de una muestra consecutiva de pacientes intervenidos quirúrgicamente por hidatidosis hepática y pulmonar en hospitales de Temuco entre julio de 2004 y septiembre de 2005. Se diseñó un protocolo de extracción de ADN para Eg en muestras homogeneizadas de aspirado de quistes hidatídicos. Se emplearon 2 sistemas de reacción de polimerasa en cadena (PCR): PCREg9 y PCREg16; ambos en concentraciones de MgCl₂ al 2mM. Para PCREg9, se utilizaron los primers Eg9F y Eg9R a concentraciones de 0.5 mM, empleándose 35 ciclos con temperatura de hibridación a 60°C. Para PCREg16 se utilizaron los primers Eg16F y Eg16R a concentraciones de 0,5 mM, empleándose 35 ciclos con temperatura de hibridación a 65°C. Los productos de las PCR fueron digeridos con una enzima de restricción (Rsa1) para la discriminación de los genotipos. **Resultados:** Se analizaron 25 muestras, 4 provenientes de quistes pulmonares y 21 de quistes hepáticos. Se logró amplificación de Eg en 22 de 25 muestras (88%). La digestión enzimática reveló la presencia de 3 genotipos posibles: en 21 de 22 muestras (95,45%) se observó un patrón de restricción correspondiente a los genotipos G1 ó G7 y en la muestra restante a los genotipos G4 ó G7. **Conclusión:** Con los sistemas de PCR empleados se detectó ADN de Eg.

PALABRAS CLAVE: *Equinococcosis, hidatidosis, genotipos, reacción de polimerasa en cadena.*

SUMMARY

Introduction: Environmental variability of *Echinococcus granulosus* (Eg) has been described. 10 genotypes have been reported as well as a certain intergenotype heterogeneity in studies with material of animal origin. The aim of this study is to describe the results of an Eg genotyping protocol in samples of human hydatidosis. **Materials and methods:** Cross-sectional study. The hydatid fluid was collected from

*Recibido 14 de Noviembre de 2005 y aceptado para publicación el 6 de junio de 2006.

Correspondencia: Dr. Carlos Manterola

Departamento de Cirugía, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D. Temuco, Chile.

Fax: 56-45-325761

E-mail: cmantero@ufro.cl

a consecutive sample of patients operated on for hepatic and pulmonary hydatidosis at hospitals in Temuco between July, 2004 and September, 2005. A DNA extraction protocol was designed for Eg in homogenized samples of hydatid cyst aspirate. 2 polymerase chain reaction (PCR) systems were used: PCREg9 and PCREg16; both in concentrations of 2mM MgCl₂. For PCREg9, Eg9F and Eg9R primers were used at concentrations of 0.5 mM, using 35 cycles with a hybridization temperature of 60°C. For PCREg16 Eg16F and Eg16R primers were used at concentrations of 0.5 mM, using 35 cycles with a hybridization temperature of 65°C. The PCR products were absorbed with a restriction enzyme (Rsa1) in order to distinguish the genotypes. *Results:* 25 samples were analyzed, 4 from pulmonary cysts and 21 from hepatic cysts. Eg amplification was achieved in 22 of the 25 samples (88%). The enzymatic digestion revealed the presence of 3 possible genotypes: in 21 of 22 samples (95.45%) a restriction pattern was observed corresponding to the G1 or G7 genotypes, and the remaining samples to the G4 or G7 genotypes. Conclusion: With the PCR systems used, Eg DNA was detected.

KEY WORDS: *Echinococcosis*"[MeSH], "Hydatidosis"[Multi], "Genotype"[MeSH], "Genotype/ classification"[MeSH], "Polymerase Chain Reaction"[MeSH].

INTRODUCCIÓN

El *Echinococcus granulosus* (Eg), se caracteriza por presentar una gran variación en relación a la especificidad del huésped, epidemiología, morfología, biología del desarrollo, bioquímica, fisiología y genética¹. Se han identificado variantes o cepas subespecíficas, de tal forma, que algunos grupos han propuesto una revisión de la taxonomía del género *Echinococcus*^{2,3}. Estas variantes subespecíficas serían alrededor de 10 genotipos distintos del parásito (G1 a G10)⁴⁻⁶, los que se han asociado a diferentes animales, como ovejas, cerdos, caballos, camellos, bovinos, cabras, etc.⁷⁻¹⁰. Sin embargo, la validez del genotipo G9 ha sido cuestionada pues podría corresponder al genotipo G7¹¹ (Tabla 1).

Uno de los criterios utilizados en estos estudios fue el análisis de diagramas de bandas de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)¹². Esta técnica, se ha demostrado como rápida y confiable, y tiene ventajas sobre otras técnicas utilizadas (morfología larval, desarrollo *in vitro*, pautas de isoenzima y proteínas SDS-PAGE). Resultados preliminares, utilizando estos tipos de análisis fueron obtenidos por González y cols. en la validación de un método alternativo para discriminar los genotipos de *Eg* en España, donde según sus resultados, sólo existirían tres genotipos (G1, G4 y G7)¹³. Esta técnica, tiene una apropiada validez interna y externa, situación que hace interesante intentar su reproducción en otros centros.

La hipótesis de este estudio es que existen diferentes genotipos de *Eg* en los pacientes portadores de hidatidosis intervenidos quirúrgicamente en centros de salud de la red sanitaria de la ciudad de Temuco.

El objetivo de este estudio fue genotipificar *Eg* en quistes hidatídicos de pacientes portadores de

hidatidosis intervenidos quirúrgicamente en centros de salud de la red sanitaria de la ciudad de Temuco, mediante técnicas de biología molecular.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño: Estudio de corte transversal con material biológico.

Criterios de inclusión: Especímenes de hidatidosis humana de cualquier localización obtenida a partir de pacientes intervenidos quirúrgicamente en centros de salud de la red sanitaria de la ciudad de Temuco, Chile; sin restricciones de edad, género ni etnia. No se consideraron criterios de exclusión.

Tipo de muestreo: Se aplicó un muestreo de tipo no probabilístico consecutivo.

Tratamiento de las muestras: Se recolectó la totalidad del líquido hidatídico de cada espécimen incluido, obteniéndose 50 ml para su ulterior trata-

Tabla 1
CEPAS DE Eg DESCRITAS HASTA LA
ACTUALIDAD^{5-7,13,16-23}

Cepas	Huéspedes que parasita
G1	Oveja doméstica y animales domésticos. Humanos
G2	Oveja de Tasmania y Tucumán. Humanos
G3	Búfalos
G4	Caballo y perro
G5	Bovinos
G6	Camellos y perros. Humanos
G7	Cerdos
G8	Cepa del norte
G9	Cerdos
G10	Cervid Fennoscandian Roedores de Finlandia

miento. Éstos, fueron posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 10 min para obtener un concentrado de protoescolices, el cual fue almacenado a -20°C en etanol 70% hasta su análisis.

Extracción de ADN de *Eg*: Una alícuota de 1,5 ml, de la muestra almacenada se centrifugó y el concentrado de protoescolices fue lavado en PBS. Posteriormente se agregó Buffer de lisis¹⁴, proteínasa K (200 µg/ml) y se incubó a 63°C hasta la desaparición de los elementos sólidos. Luego se realizó un paso por fenol-cloroformo, se precipitó el ADN con isopropanol, se hidrató en buffer TE 14 y se almacenó a -20°C hasta su estudio.

Reacción de polimerasa en cadena (PCR): Se emplearon 2 sistemas de PCR (Eg9 y Eg16), utilizando 2 pares de iniciadores dirigidos a 2 fragmentos de ADN genómico del *Eg* cuyas secuencias han sido previamente publicadas por González y cols.¹³. En ambas PCR se emplearon concentraciones de 0,5 µM de iniciadores y 2 mM de magnesio. La temperatura de hibridación fue de 60°C para la PCR Eg9 y de 65°C para la PCR Eg16.

Genotipificación: Los productos de las PCR fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción Rsa1 (1U/ul) por 14 hrs. a 37°C. Posteriormente, fueron corridos en geles de poliacrilamida al 12% y teñidos con bromuro de etidio. Los resultados se interpretaron según patrones de restricción publicados por González y cols.¹³.

Aspectos éticos: Se obtuvo el consentimiento para la utilización del material biológico extraído en los pacientes con hidatidosis, asegurando la ulterior confidencialidad de la información obtenida del estudio.

Plan de análisis: Se realizó un análisis exploratorio de los datos; posteriormente se aplicó estadística descriptiva, con cálculo de porcentajes, medianas y valores extremos para el reporte de las variables propias de los pacientes y los quistes. Finalmente se describieron aspectos inherentes a la genotipificación.

RESULTADOS

Se analizaron 25 especímenes, provenientes de 25 pacientes con una mediana de edad de 41 años, 64% de los cuales eran de género femenino. Cuatro especímenes provenían de quistes pulmonares y 21 de quistes hepáticos (las características generales de los quistes se resumen en la Tabla 2).

Se logró amplificar ADN de *Eg* en 22 de 25 muestras (88%) (Figuras 1 y 2). La digestión enzimática reveló la presencia de 3 genotipos posibles: en 21 de 22 muestras (95,45%) se observó un patrón de restricción correspondiente a los genoti-

Tabla 2
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES EN ESTUDIO

Variable	Mediana (mín. - máx.)
Edad (años)	41 (16-89)
Diámetro (cm)*	12 (7-18)
Género	
Femenino	16
Masculino	9
Número de quistes por paciente	
Único	24
Dos o más**	1
Localización	
Hígado	21
Pulmón	4

*Diámetro de la lesión principal.

**Sólo fue estudiada la lesión principal.

pos G1 o G7 y en la muestra restante a los genotipos G4 o G7 (Figuras 3 y 4).

DISCUSIÓN

Con los sistemas de PCR empleados se detectó ADN de *Eg*. El uso de una sola enzima de restricción no es suficiente para la identificación categórica de un genotipo específico, hecho que se resolverá con la aplicación de enzimas de restricción adicionales a las muestras del estudio y la ulterior secuenciación de los fragmentos amplificados.

En relación al conocimiento previo, nos parece relevante comentar algunos de los estudios relacionados existentes: Bowles y cols., estudiaron las

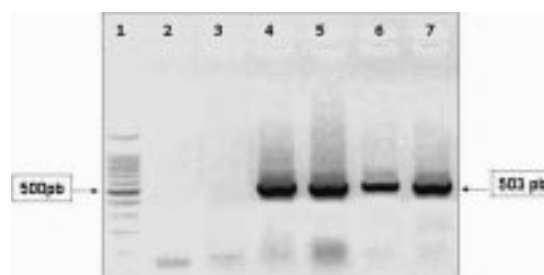


Figura 1. PCR Eg9. Detección de ADN de *Eg* en muestras de hidatidosis humana. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se aprecia un marcador de peso 100pb; en el carril 2, el control blanco; en el carril 3, el control negativo; y, en los carriles 4 al 7 las muestras positivas.

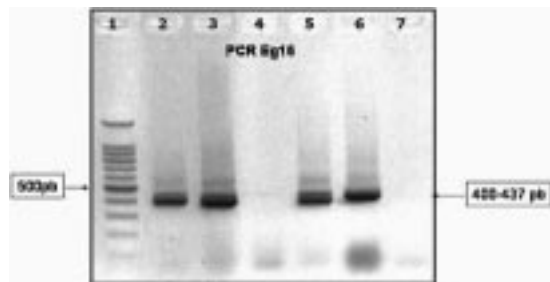


Figura 2. PCR Eg16. Detección de ADN de Eg en muestras de hidatidosis humana. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se aprecia un marcador de peso 100pb; en los carriles 2, 3, 5 y 6 se observan las muestras positivas; en el carril 4, el control negativo; y, en el carril 7, el control blanco.

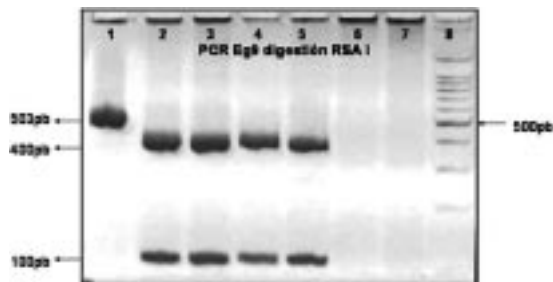


Figura 3. Digestión de productos PCR Eg9 con la enzima RSA I. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa el control blanco; en el carril 7, el control negativo; en el carril 8, el marcador de peso 100pb; el carril 1 no corta; y, en los carriles 2 al 5, se aprecian las muestras positivas digeridas con RSA I con fragmentos de aproximadamente 400 y 100 pb.

características genéticas del Eg variedad “cepa del norte” aplicando análisis con PCR, encontrando que esta variedad presentaba ambigüedades en la posición 18, que la hacían similar a la estructura del genotipo G1, G2 y G3. Por otra parte, cuando aplicaron el protocolo de secuencia mitocondrial, observaron similitud con el genotipo G6 y G7. Las reacciones observadas, les hicieron plantear que el Eg variedad “cepa del norte” representaría un genotipo especial, al que se denominó G8⁵. Por su parte, Siles-Lucas y cols., estudiaron mediante diferentes técnicas de biología molecular, aislamientos de Eg procedentes de Suiza y España, encontrando que las muestras exhibían patrones de bandas característicos de caballo y burro (en aislamientos provenientes de Suiza y España), de vacunos (en aislamientos procedentes de Suiza), de ovinos (en aislamientos provenientes de España), de cerdos (en aislamientos provenientes de Suiza y España) y de caprinos (en aislamientos procedentes de España)¹⁵. Posteriormente, Scott y cols., publicaron aislamientos de Eg provenientes de Polonia, de humanos y cerdos; las muestras fueron procesadas mediante secuenciación nuclear y mitocondrial, y posterior aplicación de enzimas de restricción, observando que los humanos no estaban infectados con el genotipo G1, sino que en ellos se aisló un genotipo similar al G7, que representaría un genotipo de Eg distinto y al que denominaron G9⁶. Zhang y cols., analizaron 28 aislamientos de Eg provenientes de la región de Xinjiang Uygur en China. Las muestras fueron obtenidas a partir de ovejas, bovinos, camellos y de quistes hidatídicos humanos; y, tras aplicar un protocolo de secuenciación de ADN, determinaron la existencia de los genotipos G6 y G1. Este último genotipo fue aislado

en forma exclusiva de muestras provenientes de la zona norte de la provincia de Xinjiang Uygur¹⁶. El mismo equipo anterior publicó el resultado del análisis de 16 aislamientos de *Echinococcus* provenientes de pacientes iraníes que habían sido intervenidos quirúrgicamente y de animales domésticos (incluyendo ovejas, bovinos, cabras y camellos) del área geográfica de Teherán. Las muestras fueron tratadas mediante un protocolo de análisis de los nucleótidos de ADN; y tras aplicar una reacción de PCR y enzimas de restricción, encontraron dos genotipos diferentes G6 y G1¹⁷. Dos años después, Snabel y cols., estudiaron el genotipo de protoscólices de cerdo provenientes del territorio eslovaco, aplicando un protocolo de secuenciación mitocondrial y nuclear, encontrando una alta afinidad de las muestras con el genotipo G7, el que se constituyó en el primer reporte de la existencia del

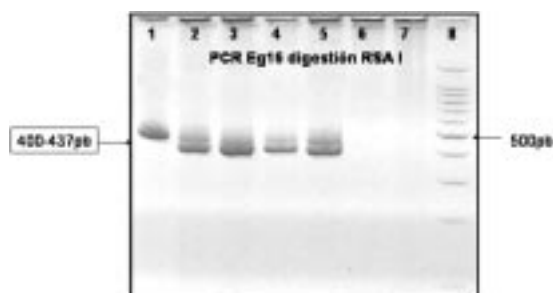


Figura 4. Digestión de productos PCR Eg16 con la enzima RSA I. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1 al 5 se observan muestras positivas para Eg no digeridas con la enzima RSAI; en el carril 6, el control blanco; en el carril 7, el control negativo; y, en el carril 8, el marcador de peso 100pb.

genotipo G7 en Eslovaquia⁷. A continuación, González y cols., analizaron 53 aislamientos de *Eg* provenientes de la región central de España, y encontraron 2 grupos genéticos dentro de los aislamientos de porcinos: los genotipos G1 y G7. Esta observación podría tener un impacto significativo en la salud pública de España, ya que estos porcinos podrían infectar a seres humanos como se ha sido informado en Europa Oriental y Central¹³. El mismo año, Le y cols., estudiaron el genoma mitocondrial completo de dos genotipos de *Eg*, el G1 y el G4, los que fueron comparados con genomas de *Echinococcus multilocularis* e *Hymenolepis diminuta*, encontrándose estructuras, longitudes y composición de bases similares¹⁸. Un año después, Lavikainen y cols., estudiaron 5 aislamientos de *Eg* provenientes de roedores del noreste de Finlandia, y de acuerdo al análisis filogenético, los aislamientos se asociaban también con los genotipos G5, G7 y G8; razón por la que se planteó que se trataba de un nuevo genotipo, a la que denominaron "cepa cervid Fennoscandian" y le asignaron el genotipo G10¹⁹. Posteriormente, Rozenzvit y cols., publicaron un estudio de 33 aislamientos de *Eg* obtenidas de diferentes huéspedes y zonas de Argentina, encontrando de esta forma al menos 4 genotipos distintos: G1 (en la provincia de Río Negro), G2 (en la provincia de Tucumán), G7 (en la provincia de Santa Fé) y G6 (en las provincias de Río Negro y Buenos Aires). Este es el primer reporte de la existencia de genotipos G2 y G6 en humanos²⁰. Por su parte, Guarnera y cols., examinaron 41 pacientes con hidatidosis hepática, pulmonar, esplénica y multiorgánica; procedentes de las provincias de Neuquén y Tucumán; y encontraron el genotipo G1 en 19 pacientes; el genotipo G2, en 6 pacientes; el genotipo G5, en 1 paciente; y el genotipo G6, en 15 pacientes; hallazgo curioso pues el camello no es un animal habitual en Argentina²¹. Daniel Mwambete y cols., analizaron muestras de quistes que se obtuvieron de ovejas, cabras, vacas, cerdos y caballos sacrificados en mataderos locales del centro de España, a los que se adicionaron especímenes provenientes de quistes hidatídicos humanos y de jabalíes cazados en la zona central de España. Trabajaron con 248 aislamientos provenientes de quistes hepáticos y pulmonares de similar grado de fertilidad; aplicaron reacciones de amplificación con PCR, encontrando 3 diferentes genotipos: G1 (de alta fertilidad y preferente en ovejas), G4 (sin preferencia de huéspedes y de localización exclusiva en el hígado de los animales parasitados), y G7 (de preferencia por cerdos, en los que se observó una fertilidad superior en quistes hepáticos que pulmonares)²². Finalmente,

Mírad y cols., estudiaron 372 quistes procedentes de 50 humanos, 166 bovinos, 153 ovejas y 3 camellos (todos originarios de Túnez). Tras aplicar un análisis con PCR-RFLP, encontraron que todas las muestras humanas, ovinas y bovinas correspondían al genotipo G1; y, que las muestras de camello se relacionaban con el genotipo G6²³.

Los estudios antes mencionados permiten visualizar la gran variabilidad de genotipos encontrados en los distintos huéspedes y en diferentes áreas del planeta, hecho que avala la relevancia de conocer los genotipos que afectan a nuestros pacientes, pues éstos pueden ser diferentes incluso en distintas áreas geográficas del territorio nacional de nuestro país.

Por lo anteriormente expuesto, es que nos parece fundamental continuar con esta línea de investigación, con el propósito ulterior de conocer el mapa genético del o los genotipos que afectan a nuestra población y eventualmente plantear estrategias posteriores, como la elaboración de vacunas como medio efectivo de prevención primaria de esta enfermedad que tantos recursos humanos y económicos hace consumir al erario nacional.

REFERENCIAS

1. Thompson RCA, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variations of the genus of *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 1988; 27: 209-258.
2. Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv. Parasitol* 1995; 35:145-176.
3. Thompson RCA. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools-towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol* 2002; 32: 493-496.
4. Bowles J, Blair D, MacManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54: 165-174.
5. Bowles J, Blair D, MacManus DP. Molecular genetic characterization of the cervid strain ("northern form") of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 1994; 109: 215-221.
6. Scott JC, Stefaniak J, Pawlowsky Zc, MacManus DP. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 1997; 114: 37-43.
7. Snábel V, D'Amelio S, Mathiopoulos K, Turceková L, Dubinsky P. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J. Helminthol* 2000; 74: 177-181.
8. Cuesta-Bandera C, McManus DP, Rishi AK. Characterization of *Echinococcus granulosus* of Spanish origin by DNA restriction endonuclease analysis and

- Southern blot hybridization. *Int J Parasitol* 1988; 18: 137-141.
9. Siles-Lucas M, Benito MC, Cuesta-Bandera C. *Echinococcus granulosus*: genomic and isoenzymatic study of Spanish strains isolated from different intermediate hosts. *Vet Parasitol* 1996; 63: 273-282.
 10. Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Differentiation of Spanish strains of *Echinococcus granulosus* using larval rostellar hook morphometry. *Int J Parasitol* 1997; 27: 41-49.
 11. Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Observations on the *Echinococcus granulosus* horse strain in Spain. *Vet Parasitol* 1998; 76: 65-70.
 12. Olivier M, Meehl MA, Lust G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies. *J Hered* 1999; 90: 78-82.
 13. González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Gárate T, Cuesta-Bandera C. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol* 2002; 102: 45-56.
 14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2^{da} ed. Cold Spring Harbor Laboratory 1989. Book 3. Appendix B: Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning.
 15. Siles-Lucas M, Feillesen R, Cuesta-Bandera C, Gottstein B, Eckert J. Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolated of *Echinococcus granulosus* by Southern hybridization and random amplified polymorphic DNA technique. *Appl Parasitol* 1994; 35: 107-117.
 16. Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP. Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 171-174.
 17. Zhang LH, Chai JJ, Jiao W, Osman Y, McManus DP. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Parasitology* 1998; 116: 29-33.
 18. Le TH, Pearson MS, Blair D, Dai N, Zhang LH, McManus DP. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2002; 124: 97-112.
 19. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirleva-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2003; 127: 207-215.
 20. Rozenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 1999; 118: 523-530.
 21. Guarnera EA, Parra A, Kamenetzky L, Garcia G, Gutierrez A. Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Trop* 2004; 92: 153-159.
 22. Daniel Mwambete K, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop* 2004; 91: 87-93.
 23. M'rad S, Filisetti D, Oudni M, Mekki M, Belguith M, Nouri A. *et al.* Molecular evidence of ovine (G1) and camel (G6) strains of *Echinococcus granulosus* in Tunisia and putative role of cattle in human contamination. *Vet Parasitol* 2005; 129: 267-272.