

Manual práctico

de microbiología y parasitología

Noraida del C. Mosqueda G.

Aya Carolina Ramírez A.



Manual práctico de microbiología y parasitología

Manual práctico de microbiología y parasitología

- Noraida del C. Mosqueda
- Ana C. Ramírez A.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Autoridades Universitarias

- *Rector*
Léster Rodríguez Herrera
- *Vicerrector Académico*
Humberto Ruiz Calderón
- *Vicerrector Administrativo*
Mario Bonucci Rossini
- *Secretaria*
Nancy Rivas de Prado

PUBLICACIONES
VICERRECTORADO
ACADÉMICO

- *Director*
Humberto Ruiz Calderón
- *Coordinador editorial*
Luis Ricardo Dávila
- *Asistente editorial*
Yelliza García
- *Consejo editorial*
Tomás Bandes
Asdrúbal Baptista
Rafael Cartay
Mariano Nava
Román Hernández
Gregory Zambrano

COLECCIÓN

Textos Universitarios

Comité editorial

María del Carmen Araque
Raquel Flores
Bernardo Fontal
Hebert Lobo
Josefina Peña
Marlene Peñaloza
Iris Perdomo
José Villalobos

COLECCIÓN

Textos Universitarios

Publicaciones
Vicerrectorado
Académico

Manual práctico de microbiología y parasitología

Primera edición, 2008

© Universidad de Los Andes
Vicerrectorado Académico
CODEPRE

© Noraida de C. Mosqueda
Ana C. Ramírez

- *Concepto de colección*
Kataliñ Alava
- *Corrección*
Miguel Araque / Raúl Gamarra (Vicerrectorado Académico)
- *Diseño y diagramación*
Marian A. Saavedra
- *Impresión*
Centro Editorial Litorama, C.A.

HECHO EL DEPÓSITO DE LEY
Depósito legal: LF23720076105110
ISBN: 978-980-11-1133-7

Derechos reservados
Prohibida la reproducción total
o parcial de esta obra sin la autorización
escrita del autor y el editor

Universidad de Los Andes
Av. 3 Independencia
Edif. Central del Rectorado
Mérida, Venezuela
e-mail: publicacionesva@ula.ve
web: <http://viceacademico.ula.ve/publicacionesva>

Los trabajos publicados
en la Colección Textos Universitarios
han sido rigurosamente
seleccionados y arbitrados
por especialistas en las
diferentes disciplinas

Impreso en Venezuela
Printed in Venezuela

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Autoridades Universitarias

- *Rector*
Mario Bonucci Rossini
- *Vicerrectora Académica*
Patricia Rosenzweig
- *Vicerrector Administrativo*
Manuel Aranguren Rincón
- *Secretario*
José María Andrés

PUBLICACIONES
VICERRECTORADO
ACADÉMICO

- *Dirección editorial*
Patricia Rosenzweig
- *Coordinación editorial*
Victor García
- *Coordinación del Consejo editorial*
Roberto Donoso
- *Consejo editorial*
Rosa Amelia Asuaje
Pedro Rivas
Rosalba Linares
Carlos Baptista
Tomasz Suárez Litvin
Ricardo Rafael Contreras
- *Producción editorial*
Yelliza García A.
- *Producción libro electrónico*
Miguel Rodríguez

Primera edición digital 2011

Hecho el depósito de ley

Universidad de Los Andes
Av. 3 Independencia
Edificio Central del Rectorado
Mérida, Venezuela
publicacionesva@ula.ve
publicacionesva@gmail.com
www2.ula.ve/publicacionesacademico

Los trabajos publicados en esta Colección han sido rigurosamente seleccionados y arbitrados por especialistas en las diferentes disciplinas

A los estudiantes de la escuela de Medicina, por ser la piedra angular que impulsó la redacción del presente *Manual de prácticas de laboratorio*, el cual esperamos sirva de apoyo y fortalecimiento en el aprendizaje de la Microbiología y Parasitología.

Las autoras

Nuestro más sincero agradecimiento a la planta profesoral, personal administrativo y técnico del Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas de la Escuela de Medicina-ULA.

Introducción

Las enfermedades infecciosas representan un problema de salud pública dada su alta incidencia en nuestra población, en cualquiera de sus entidades etiológicas como son las bacterias, los hongos, los virus y los parásitos. Ante esta realidad el personal de salud tiene la responsabilidad de abordar la problemática con la finalidad de proporcionar soluciones en cuanto al control y/o prevención de estas patologías.

Las enfermedades infecciosas eran consideradas anteriormente como procesos de poca trascendencia en la patología humana. Hoy día, sin embargo, se han transformado en un conocimiento de primera necesidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, para quienes las enfermedades infecciosas representan un verdadero obstáculo en su recuperación. Por su parte, el médico tratante se ve enfrentado a cuadros clínicos inespecíficos cuyo verdadero diagnóstico no es fácilmente discernible, razón por la cual debe recurrir al laboratorio en búsqueda de hallazgos que le permitan orientar el diagnóstico y proceder a la pronta instauración de una terapia antimicrobiana adecuada.

El presente manual se ha diseñado, basados en la necesidad de poder contar con un material de consulta rápida para los estudiantes de medicina en el área de microbiología, cuya finalidad es instruir sobre el uso adecuado de los recursos y técnicas convencionales que se hacen necesarias en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Se hace énfasis en los aspectos fundamentales del ejercicio de la medicina, así como en la lectura de resultados de laboratorio.

Este material consta de un total de ocho prácticas, distribuidas en forma didáctica para su comprensión en cinco prácticas en el área bacteriológica, una práctica que resume en forma sencilla las enfermedades micóticas más frecuentes y las dos últimas prácticas destinadas a reafirmar en el estudiante, los conocimientos parasitológicos impartidos en las clases teóricas. Además se incluye para cada práctica, una actividad de auto evaluación, lo cual le permitirá al estudiante, conocer cuales son sus limitantes en el aprendizaje de la materia, y podrá abordar a sus profesores con claridad de los aspectos a reforzar dentro del proceso enseñanza- aprendizaje.

Las metodologías implícitas en el presente manual, se expresan en forma clara y sencilla. Sin embargo, es importante resaltar que el avance en el campo de la Biotecnología, así como en la Ingeniería Biomédica, ha impulsado el desarrollo de técnicas de diagnóstico especializadas, que escapan a los objetivos del presente manual. No obstante, pueden ser consultadas en otras bibliografías.

Prefacio

La Microbiología es un campo del conocimiento extraordinariamente amplio, abarca aspectos de la bioquímica, biología celular, genética, taxonomía de los microorganismos, ecología microbiana, relación hospedero-parásito, entre otros. El estudiante de medicina y en consecuencia el futuro médico debe estar familiarizado con la biología de los principales grupos de microorganismos, ya que muchos de ellos son considerados verdaderos patógenos para el hombre, y causan enfermedades infecciosas, las cuales constituyen una de las principales causas de morbi-mortalidad en Venezuela.

El adecuado conocimiento de estas enfermedades está estrechamente relacionado con la epidemiología nacional, es por ello que todo profesional de la salud debe conocer que las enfermedades infecciosas y parasitarias, traspasan los límites de las especialidades médicas, razón por la cual estas patologías están relacionadas con todos y cada uno de los campos del ejercicio médico, de allí la necesidad de fortalecer la preparación de este futuro profesional para el diagnóstico y tratamiento adecuado de este grupo de patologías.

Este manual es una revisión de fundamentos teóricos y descriptivos de metodologías en el área de Bacteriología, Micología y Parasitología, considerados como conocimientos básicos e importantes para el desempeño del profesional de la medicina. Su objetivo principal es proporcionar a los estudiantes que cursan Microbiología y Parasitología, una fuente de información directa, de fácil manejo y ajustados a las patologías infecciosas más comunes en nuestras comunidades.

No obstante, con este material didáctico, se pretende ofrecer un apoyo para cualquier profesional de la salud que realice labores diagnósticas en el área de la Microbiología Clínica, ya que es un manual que permite aclarar dudas de manera rápida y sencilla, facilitando así la comprensión e interpretación de los resultados de laboratorio y permite ampliar la comunicación entre el laboratorio y el médico tratante, con un único objetivo de optimizar la calidad del diagnóstico y orientar de manera efectiva, la terapéutica a prescribir por parte del galeno, cuando este se enfrente a cualquier patología infecciosa.

En la elaboración de este material, se ha puesto insistencia particular en crear herramientas que le permitan al estudiante de medicina y áreas afines, entender e internalizar y conjugar los principios básicos de la interpretación de resultados de laboratorio, observaciones microscópicas que aunque parezcan sencillas, son cruciales para el buen y precoz manejo de todo paciente en quien se sospeche una infección.

Así mismo, para la elaboración de este Manual se contó con el conocimiento y la experiencia de varios profesionales del área de la microbiología clínica y de laboratorio, Docentes del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, lo que sin duda aporta mayor valor a su contenido, considerando el esfuerzo y dedicación de cada uno de ellos en la docencia.

En todas las revisiones y actualizaciones realizadas por los autores, se ha tomado en cuenta tanto la bibliografía nacional como la internacional y la experiencia clínica, de campo y de laboratorio de los profesores del Departamento.

Noraida Mosqueda

Prof. del Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas
de la escuela de Medicina de la Universidad de Los Andes

Objetivos generales

- Facilitar la adquisición de conocimientos en el área de la Microbiología.
- Proporcionar una descripción concisa y manejable de los aspectos de laboratorio que facilitan el diagnóstico de una enfermedad infecciosa bacteriana, micótica y parasitaria.
- Reafirmar algunos conocimientos microbiológicos impartidos en las clases teóricas de la materia.
- Proporcionar a los estudiantes, las herramientas básicas para la lectura e interpretación de los estudios de laboratorio en cuanto a las enfermedades infecciosas se refiere.

práctica 1

Reconocimiento de los equipos en el área de microbiología

Pre-requisito

1. Conocimiento previo de la actividad a realizar en el laboratorio.

Objetivo general

1. Describir el equipamiento e instrumental del laboratorio de microbiología y su uso.

Objetivos específicos

1. Describir el equipamiento, instrumental y material del laboratorio de microbiología.
2. Identificar los elementos que componen un microscopio compuesto.
3. Manejar adecuadamente el microscopio óptico aplicando una correcta técnica de enfoque.
4. Mencionar los cuidados de los equipos de laboratorio.

Marco teórico

El microscopio

Los microorganismos son tan pequeños que resulta imposible observarlos individualmente a simple vista, por lo que se hace necesario disponer de un instrumento que permita visualizarlos para distinguirlos y estudiarlos, dicho instrumento es el microscopio, el cual se

define como un sistema óptico formado por una combinación de lentes para conseguir imágenes aumentadas de tamaño que las hacen visibles al ojo humano. (1,2,3)

La palabra se deriva del antiguo griego *MICROS* que significa pequeño y *SKOPEIN*, observar. El primer microscopista fue Anthony Van Leewenhoek, quien observó por primera vez la vida microscópica en el agua de lluvia, agua de mar, sarro dentario y muchos otros materiales, y su minucioso trabajo, abrió las puertas a un mundo que finalmente condujo al dominio de muchas enfermedades y a un conocimiento más profundo de diversas estructuras. (4,5,6,7)

Un microscopio simple presenta una sola lente o cristal de aumento, mientras que el microscopio compuesto consiste en dos juegos de lentes, uno cerca del objeto a estudiar y por lo tanto se denomina objetivo. El otro juego, ocular, se encuentra cerca de nuestro ojo como el nombre lo indica. (5,7)

Además del aumento, una propiedad importante de un microscopio es su **poder de resolución** definido como la capacidad de mostrar distintos y separados, dos puntos muy cercanos entre sí. El límite absoluto del poder de resolución es casi la mitad de la longitud de onda de la luz que se usa para iluminar el objetivo, es por ello que los microscopios ópticos convencionales son incapaces de proporcionar información sobre la estructura interna de las células. Por tanto, se usan principalmente para visualizar la morfología celular y su reacción a diferentes procesos de tinción. (5,7)

La medida del poder de resolución de un objetivo es su apertura numérica, cuanto mayor sea ésta, mayor será el poder de resolución ya, que están relacionados según la siguiente expresión matemática:

$$\text{P.R.} = \frac{\lambda}{a} \quad \lambda = \text{Longitud de onda de la luz}$$

$$a = n \times \text{Sen } \alpha \quad a = \text{Apertura numérica}$$

$$\text{P.R.} = \frac{\lambda}{n \times \text{Sen } \alpha} \quad \alpha = \text{Ángulo de incidencia de la luz}$$

Donde **n** va a variar de acuerdo con los tipos de objetivos que se utilizan de tal manera que **n** es igual a 1 cuando se utilizan los objetivos secos, mientras que **n** es igual a 1,52 cuando se utiliza el lente de inmersión. (8)

Partes de un microscopio

La parte mecánica está constituida por

Base o pie: pieza que asegura la estabilidad del microscopio.

Brazo o columna: pieza colocada sobre la base del microscopio que sirve de soporte a las diferentes partes del mismo y para su transporte.

Tornillo macrométrico: son tornillos de precisión que permiten el acercamiento o enfoque basto.

Tornillo micrométrico: permite el ajuste fino de la imagen.

Tubo: soporta la parte óptica, tiene una longitud variable según el fabricante; en su parte superior se encuentra el ocular y en la parte inferior el revólver.

La platina: sirve de soporte para las preparaciones y presenta un orificio central que permite el paso de los rayos luminosos.

Subplatina: base donde va instalado el condensador, consiste en un pistón y una cremallera.

Carro: compuesto por 2 tornillos estriados que permiten desplazar la preparación en dirección lateral y antero-posterior, con lo cual se logra recorrer toda la preparación.

Revólver o portaobjetivos: pieza giratoria donde van enroscados los objetivos. (9)

La parte óptica está constituida por

Fuente de Luz: puede ser por medio de luz reflejada por un espejo, o por luz directa de lámparas de halógeno o tungsteno.

Condensador: es un sistema de lentes que concentra la luz en el objeto examinado. Está situado entre la fuente de luz y la platina, exactamente en el eje óptico.

Objetivos: son un juego de lentes enroscados en el **revólver** (pieza giratoria) con distintas potencias amplificadoras. Cada objetivo está marcado con su poder de amplificación en diámetros y está indicado por un número seguido de una "X".

Existen 2 tipos de objetivos: **secos**, que son aquellos que están diseñados para ser usados sin la interposición de otro medio entre la lente frontal del objetivo y el objeto, los más usados son 10X y 40X. Los de **inmersión** se utilizan sumergidos en un medio como aceite de cedro, agua o glicerina, y su aumento es de 100X.

Ocular: es un lente colocado en la parte superior del tubo portaocular. Su función es aumentar la imagen dada por el objetivo. Puede ser único o doble y su potencia amplificadora suele ser: 5X, 8X, 10X, 12,5X ó 20X (9).

Cálculo del poder de amplificación de un microscopio

El aumento o magnificación de la imagen está dado por el producto de los aumentos del ocular por el objetivo. Ejemplo: si el ocular es de 10X y estamos utilizando un objetivo de 40X, el objeto que estamos observando se ha amplificado 400 veces. (7)

Técnica de enfoque con el microscopio

1. Ajustar la iluminación del campo, para lo cual se coloca el objetivo de menor aumento, bajar completamente el condensador y el diafragma no muy abierto.
2. Montar la preparación sobre la platina, colocarla de tal modo que el centro de la preparación coincida con el orificio central de la platina.
3. Observar lateralmente y con el tornillo macrométrico, subir la platina hasta que la preparación quede cerca del objetivo de menor aumento.
4. Para iniciar el enfoque se debe accionar primero el tornillo macrométrico lentamente, de manera que el objetivo se separe lentamente de la preparación, es decir, hacer el enfoque **por alejamiento y nunca por acercamiento**, cuando se observe la muestra se termina de enfocar con el tornillo micrométrico.
5. Si se requiere observar más detalles, utilizar un objetivo de mayor aumento, para ello girar el revólver hasta que la lente ocupe el lugar de la lente anterior, previamente, se debe centrar en el campo la parte que se desee estudiar, ya que al cambiar el objetivo el campo se reduce. Rectificar el enfoque con el micrométrico y ajustar la iluminación. (9)

En la medida en que se incrementan los aumentos, la cantidad de luz requerida es mayor por lo que debe corregirse el diafragma y el condensador.

Cuando se va a utilizar el objetivo de inmersión se procede de la siguiente manera:

1. Abrir el diafragma y subir al máximo el condensador.
2. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación.
3. Colocar el objetivo en su posición efectiva y observar a través del ocular y rectificar el enfoque con el micrométrico. (9)

Microscopios ópticos especiales

Microscopio de luz ultravioleta: utiliza el rango U.V. del espectro luminoso en lugar del rango visible, lo cual permite aumentar el poder de resolución al doble en comparación con el microscopio de luz. Mejora el detalle absorbiendo selectivamente distintas longitudes de onda de la banda U.V.

Los elementos ópticos de estos microscopios están hechos de cuarzo, fluorita. (6,7)

Microscopio de campo oscuro: el microscopio de campo oscuro difiere de el microscopio de luz, sólo en que tiene un condensador especial que produce un cono tubular de luz visible. Por ello, las porciones claras de las muestras aparecen como una luz brillante sobre el fondo negro.

Este microscopio se utiliza para observar bacterias vivas, en particular aquellas que se acercan al límite de resolución del microscopio óptico, como por ejemplo *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* agente causal de la sífilis. (6,7)

Microscopio de contraste de fase: ilumina al espécimen con un cono hueco de luz, como el microscopio de campo oscuro. Sin embargo, en el microscopio de fases el cono de luz

es más estrecho y entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un cambio de fase de un cuarto de longitud de onda. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de un espécimen transparente haciéndolo visible.

Se utilizan para observar detalles individuales de microorganismos vivos y tejidos sin tinción. (6,7)

Microscopio electrónico: emplea un rayo de electrones para delinear el objeto que se observa. Existen dos tipos de microscopio electrónico: el de **transmisión** (MTE) que se usa para observar componentes subcelulares y detalles estructurales de los microorganismos, incluyendo los virus; y el de **rastreo** (MRE) que se usa para estudiar las estructuras superficiales de una muestra. (6,7)

Cuidados del microscopio

1. Si no se está usando debe cubrirse con un protector o guardarse en un sitio destinado para tal fin.
2. Cualquier líquido que se derrame sobre el microscopio se debe limpiar de inmediato.
3. La parte mecánica debe limpiarse con productos destinados para ello.
4. El objetivo de inmersión debe limpiarse inmediatamente después de ser usado, para ello usar papel especial para lentes o con un paño o gasa que no dejen pelusa, luego humedecerlo ligeramente con una mezcla etanol-metanol, secarlo con el mismo papel.
5. Los oculares se limpian con papel seco especial para lentes, gasa o paño suave.
6. Nunca use aceite de inmersión en objetivos no destinados para ello.
7. Nunca coloque el microscopio cerca del mechero encendido.
8. Guarde el microscopio con el objetivo de menor aumento en posición de enfoque.
9. El microscopio, para ser trasladado, deberá sujetarse por la parte del brazo y apoyarlo en la palma de las manos. (9,10)

Laboratorio de microbiología clínica

Las funciones más importantes del Laboratorio de microbiología clínica son examinar y cultivar muestras en la búsqueda de microorganismos, identificar el agente etiológico involucrado en la patología y llevar a cabo pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, para ello cada laboratorio debe tener una infraestructura adecuada. El laboratorio de microbiología debe constar de las siguientes áreas:

- a) Toma de muestra
- b) Aislamiento
- c) Preparación de medios de cultivos
- d) Esterilización
- e) Envasado
- f) Lavado

1 Actividad práctica

Materiales a utilizar

Mobiliario

- Silla de toma de muestra
- Camilla
- Escritorio
- Archivo
- Mesones

Equipos

- Microscopio óptico
- Microscopio estereoscópico
- Nevera
- Estufa
- Centrífuga
- Campana de flujo laminar
- Balanza
- Plancha de calentamiento
- Autoclave
- Cámara de video / Televisores / Microscopio

Materiales

- Hisopos
- Baja lenguas
- Portaobjetos
- Jeringas
- Asa de platino (en aro y en punta)
- Pinzas
- Mechero
- Pipetas Pasteur
- Colorantes
- Palillos de madera estériles
- Papel de filtro
- Jarras para anaerobiosis y microaerofilia.
- Cristalería (tubos de ensayo, placas de Petri, pipetas serológicas, fiolas, vaso de precipitado, etc.)

- Medios de cultivos y otros reactivos.
- Videos previamente estructurados

Procedimiento

Parte I

Se proyectará un vídeo elaborado en las áreas de investigación del Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas de la escuela de Medicina de la Universidad de Los Andes, para que el estudiante conozca los equipos de laboratorio y la utilidad de cada uno de ellos en el Laboratorio de Microbiología.

Parte II

Cada estudiante dispondrá de un microscopio, con la finalidad de Identificar cada una de sus partes y sus funciones.

Figura 1

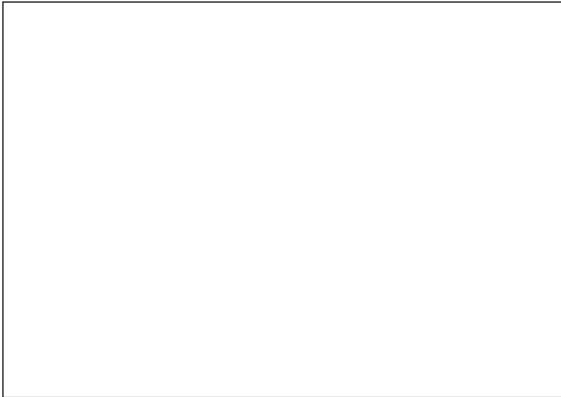
Partes del microscopio óptico



Parte III

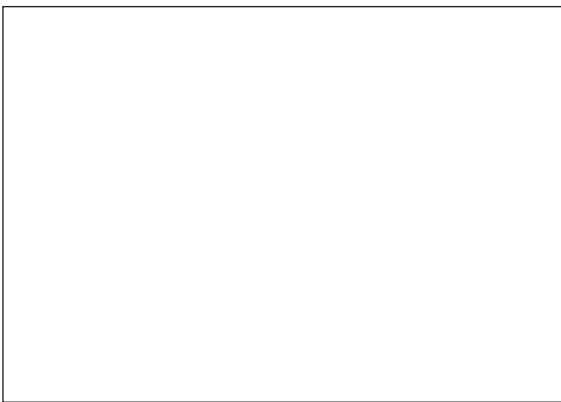
Cada estudiante enfocará una preparación siguiendo la técnica explicada anteriormente.

Dibuje lo observado:

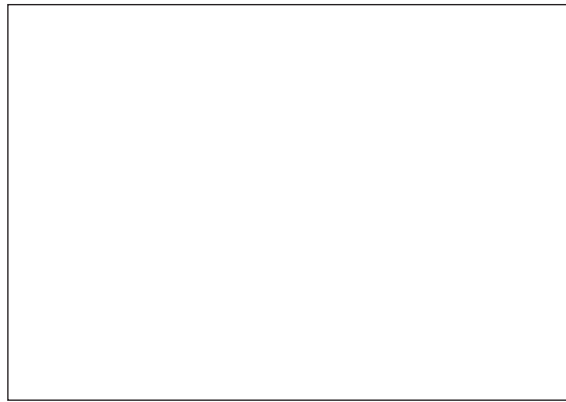


Indique el aumento o magnificación de la imagen observada:

Observación de preparaciones con objetivos de diferentes aumentos



Objetivo de 10 X



Objetivo de 40 X

Indique el aumento o magnificación de las imágenes observadas:

Autoevaluación

1. En relación con los cuidados del microscopio, señale la alternativa correcta.
 - a. Siempre se debe trabajar con el microscopio cerca del mechero para evitar la contaminación de la muestra.
 - b. El microscopio para ser trasladado deberá sujetarse por la parte del brazo y apoyarse en el revolver.
 - c. No se recomienda usar aceite de inmersión para los objetivos secos.
 - d. La parte mecánica deberá limpiarse periódicamente con sustancias desengrasantes.

2. Cuál de los siguientes elementos constituyen partes mecánicas del microscopio.
 - a. Ocular, Carro y Subplatina
 - b. Objetivos, Condensador y Base
 - c. Condensador, Subplatina y Objetivos
 - d. Brazo, Carro y Platina.

3. Señale la función que cumple el tornillo macrométrico.
 - a. Obtener un enfoque exacto del objeto a observar
 - b. Permite un acercamiento basto
 - c. Permite un movimiento rotatorio para usar varios objetivos
 - d. Sostiene el ocular y el revólver

4. Cuando se va a utilizar el objetivo de inmersión se deben cumplir las siguientes recomendaciones.
 - a. Cerrar el diafragma y cerrar al máximo el condensador
 - b. Subir al máximo el condensador y abrir el diafragma
 - c. Utilizar el objetivo cuya distancia de trabajo es mayor de 10X
 - d. Utilizar el objetivo que permite amplificar el objeto 400 veces su tamaño

5. En la técnica de enfoque con el microscopio se debe ajustar la iluminación, montar la preparación, subir la platina y para enfocar debemos:
 - a. Separar el objetivo de la preparación con el tornillo micrométrico
 - b. Separar el objetivo de la preparación con el tornillo macrométrico y enfocar por alejamiento.
 - c. El objetivo debe separarse rápidamente de la preparación y enfocar por acercamiento.
 - d. Acercar el objetivo a la preparación y enfocar por acercamiento.

Complete los siguientes planteamientos.

1. El poder de resolución del microscopio depende de:

2. Calcule el poder de resolución de un objeto, el cual es observado con un microscopio óptico, utilizando un ocular de 10x y un objetivo de 100x

Referencias bibliográficas

- (6) Steaman. *Diccionario de ciencias médicas*. 25^a ed. Argentina: Médica Panamericana; 1993.
- (7) Volk, W. *Microbiología básica*. 7ma. ed. México: Harla. S.A; 1996.
- (8) Joklik W., Willett H., Amos B., Wilfert, C. Zinsser *Microbiología*. 20^a ed. Argentina: Médica Panamericana.
- (9) Tarazón, S. y Flores, T. *Parasitología. Manual de Trabajos Prácticos*. Venezuela: Ediluz; 1996.
- (10) Barrios A. *Bacteriología y Virología Básicas*. Venezuela: Editorial Venezolana, C.A; 1988.