

Д-р Николай Кълвачев,¹г-р Любена Андонова,²доц. Майда Тихолова,³проф. Татяна Червенякова,²доц. Ива Христова¹¹Национален център по заразни и паразитни болести, София²СБАЛИПБ „Проф. Иван Киров“ ЕАД, София³Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, Медицински университет, София

Система SYBR Green I Real-time RT-PCR за доказване и анализ на инфекция, причинена от вируса на кримската-конго хеморагична треска

Резюме

Кримската-Конго хеморагична треска (ККХТ) е остро вирусно заболяване с установени ендемични райони у нас. Ранната, бърза и точна диагностика е особено важна при suspectivните за ККХТ пациенти и от голямо значение за предотвратяване на нозокомиални инфекции. Молекулярните техники от типа на RT-PCR в реално време отскоро се използват за диагностика на ККХТ в нашата страна. Адаптираните протоколи за доказване на вируса на ККХТ чрез този метод са бързи, специфични и чувствителни, подходящи за ранното откриване на пациенти, съмнителни за тази инфекция. Чрез настоящите проучвания са изработени и оптимизирани протоколи за диференциално-диагностичен алгоритъм при болни, suspectivни за инфекция с вируса на ККХТ. Разработен е SYBR Green I Real-time RT-PCR за определяне на нивото на антигенемия на вируса на ККХТ. Построена е стандартна регресионна права, използвайки положителна контрола, върху която са интерполирани резултатите от изследванията на различни клинични материали (кръв/серум от пациенти, съмнителни за инфекция с ККХТ). Построената стандартна регресионна права бе използвана за изясняване на моментното състояние на инфекцията, както и за прогнозиране на нейния ход. Използвани са паралелно вирусологични и серологични тестове, чрез които резултатите бяха допълнени и съпоставени.

Ключови думи: Кримска-Конго хеморагична треска, бърза диагностика, RT-PCR в реално време.

SYBR Green I Real-time RT-PCR System For Detection And Analysis Of Infection Caused By Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus

Nikolay Kalvatchev,¹ Liubena Andonova,² Mayda Tiholova,³ Tatiana Tserveniakova,² Iva Christova¹

¹National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia²SHIPD „Prof. Ivan Kirov“, Sofia³Department of Infectious diseases, Parasitology and Tropical Medicine, Medical University, Sofia

Abstract

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is an acute viral disease with known endemic areas in Bulgaria. Early, rapid and accurate diagnosis is particularly important in patients suspected of CCHF and of main importance for the prevention of nosocomial infections. Molecular techniques such as real time RT-PCR have recently been introduced for diagnosis of CCHF in the country. Adapted protocols and methods for CCHFV detection through this study are fast, specific and sensitive, useful for early recognition of these patients. We optimize the differential diagnostic algorithm in patients suspected to have CCHFV infection. Thus, SYBR Green I Real-time RT-PCR was developed to determine the level of CCHFV in blood of infected patients. A standard regression line has been built with a CCHFV RNA positive control. Different clinical specimens (blood and serum) from suspected and positive patients have been analyzed after viral RNA extraction. This standard line was used to clarify the current status of infection and to predict its course. Virological and serological tests were used in parallel to supplement and compare the results.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever, rapid diagnosis, real time RT-PCR.

Кримската-Конго хеморагична треска (ККХТ) е вирусно заболяване, често протичащо тежко и завършващо летално. ККХТ се причинява от вируси от род *Nairovirus*, принадлежащи към семейство *Bunyaviridae*. Болестта е остро инфекциозно заболяване. Протича с общ токсикоинфекциозен, краниофарингеален и хеморагичен синдром. Има характера на природо-огнищно заболяване, с резервоар диви и домашни животни, а като вектор служат някои видове кърлежи.^{1,4}

ККХТ е широко разпространена по света. На практика заболяването е ендемично в големи райони на Азия, в южна Русия, в Африка и близкия Изток, като има и отделни фокални огнища в Югоизточна Европа. Случаи и епидемии през последните години са наблюдавани в Косово, Албания, Иран, Пакистан, ЮАР, Турция, а през 2008 г. за пръв път заболяването бе регистрирано и в съседна Гърция.⁵ У нас са установени ендемични региони в Шуменско, Разградско, В. Търновско, Пловдивско, Пазарджишко, Хасковско, Бургаско и Гоце Делчевско. Спорадични случаи и огнища на ККХТ в страната ни се откриват все по-често.³ Така например, през пролетта на 2008 г. в лабораторията по Кърлежово/векторно преносими инфекции към Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ) бяха доказани няколко случая от Гоце Делчев, през 2007 г. бяха регистрирани 7 положителни проби от пациенти, а през 2002 г. общо 54 случая бяха потвърдени.

Ранната, бърза и точна диагностика е особено важна при суспектните за ККХТ пациенти и от голямо значение за предотвратяване на нозокомиални инфекции. Молекулярните техники от типа на Real-time RT-PCR, конвенционалния RT-PCR и nested-PCR значително превъзхождат серологичните методи за поставяне на диагноза през ранната фаза на тази инфекция, тъй като при тях се цели амплификация на вирусната РНК във фазата на вiremия.² От друга страна, Real-time RT-PCR чрез възможността за анализ на флуоресцентното излъчване по време на амплификация и сравнение на кривата на топене при крайните PCR продукти, цели поставяне на окончателна диагноза в реално време в рамките на няколко часа след получаване на клиничните материали.

Целта на настоящия труд бе да се проучат пациенти с характерна клинична картина за ККХТ с помощта на Real-time RT-PCR и да се определят количествените характеристики, причинени от вируса на ККХТ.

Общо 68 серологични и вирусологични клинични материали от суспектни за ККХТ болни бяха събрани от различни региони на България. Пациентите с фебрилитет, токсикоинфекциозен и хеморагичен синдроми, развили се след контакт с кърлеж или при наличие на епидемиологична връзка с болен от или суспектни за ККХТ бяха диагностицирани чрез доказване на специфична вирусна РНК, амплифицирана с SYBR Green I Real-time

RT-PCR. Тази реакция не бе използвана досега в България в областта на ККХТ рутинно. Разработването на този молекулярен метод с характер на определяне първоначалното ниво на антигенемия даде възможност да се съпостави количеството антигени (специфична вирусна РНК) в кръвотока с тежестта на протичане на ККХТ.

Материали и методи

Подбиране на пациенти, съмнителни за ККХТ

В октомври 2010–юли 2011 бяха събрани и изследвани общо 68 проби от пациенти. Извършихме анализи на 43 серумни и 25 кръвни проби на пациенти с анамнеза и статус, съмнителни за инфекция с вируса на ККХТ – неизяснен фебрилен синдром, токсикоинфекциозен и/или хеморагичен синдроми, развили се след контакт с кърлеж или съмнение за такъв.

Всички клинични материали бяха вземани целенасочено от лекари инфекционисти след специализиран преглед и/или по време на диагностични или терапевтични манипулации. Изследвани бяха пациенти от цялата страна, но най-много от инфекциозни отделения, намиращи се в различните природо-огнищни зони на ККХТ.

Вземане, съхранение и транспортиране на клиничните материали до лабораторията за изследване

От особено значение е правилното вземане, съхранение и транспортиране на клиничните материали към лабораторията. За вирусологично изследване във вакутейнер се вземаше цялостна кръв. При изследването на кръвта чрез полимеразната верижна реакция (PCR) за предпочитане бе антикоагулантът да е цитрат или ЕДТА. Вакутейнерът задължително се транспортираше в хладилна чанта или термос с лед или се съхраняваше в минусова камера до момента на транспортирането.

За серологично изследване внимателно се отпипетираше серум от центрофугираната кръв (2000 оборота в минута за 5 минути) и се поставяше в стерилен контейнер, поне 0.5 ml. Серумът не се замразяваше, за да се запази реалният титър на антителата, а се съхраняваше в хладилник (2–8°C) до момента на изследването.

Екстракция на вирусна РНК

За целите на изследванията бе екстрахирана тотална РНК от цялостна кръв или серум от болни чрез QIAamp® Viral RNA Mini kit. Приготвят се порции работен разтвор на carrier RNA, AVL buffer, AW1 и AW2 буфери съгласно инструкцията на кита.

Прилагане на SYBR Green I RT-PCR за доказване на вируса на ККХТ

Индикаторната система SYBR® Green I беше използвана за детекция на малкия вирусен геном от вируса на ККХТ, както и за бърз скрининг на клиничните материали. Различните експерименти на PCR бяха провеждани с Script One-Step RT-PCR Kit With SYBR® Green I. В процеса на работа бяха следвани инструкциите на производителя, като предварително беше извършено титриране на концентрацията на праимерните двойки, с цел определяне на оптималните им работни концентрации.

Всички оптимизирани реакционни смеси бяха проведени в краен обем 50 µl и съдържаха: 25 µl SYBR® Green съдържащ буфер, 10 µl ddH₂O, 2 µl от всеки праимер (Forward-Reverse), 10 µl екстрахирана вирусна РНК и 1 µl обратна транскриптаза. След края на всяка амплификационна реакция беше извършван анализ на кривата на топене (melting curve analysis). Стандартните калибрационни криви бяха изобразени графично чрез илюстриране на флуоресцентното излъчване по време на амплификацията, което е правопрпорционално на количеството образувани специфични ампликони. Изчисленията се провеждаха с помощта на специалния софтуер на термосайклер Opticon-2 (MJ Research/ Bio-Rad, USA).

Количествен real-time SYBR Green I RT-PCR

С помощта на Script One-Step RT-PCR Kit With SYBR® Green I беше провеждан количественият анализ на изследваните проби. За построяване на стандартните криви бяха направени необходимите серийни разреждания на положителната контрола (V42/81), както е посочено в табл. 1. Количеството тотална РНК беше измервано спектрофотометрично, използвайки Jenway 6300 spectrophotometer.

Разреждания	Приготвяне	Обем в реакция	RNA/реакция
A1	Краен обем след екстракция (V42/81)	5 µl	50 ng/µl (1:1)
A2	4 µl A1 + 36 µl ddH ₂ O	5 µl	5 ng/µl (1:10)
A3	4 µl A2 + 36 µl ddH ₂ O	5 µl	0.5 ng/µl (1:100)
A4	4 µl A3 + 36 µl ddH ₂ O	5 µl	0.05 ng/µl (1:1000)

Табл. 1. Приготвяне на серийни разреждания на положителната контрола V42/81

Прилагане на ELISA за доказване на антитела Ig M и Ig G срещу вируса на ККХТ

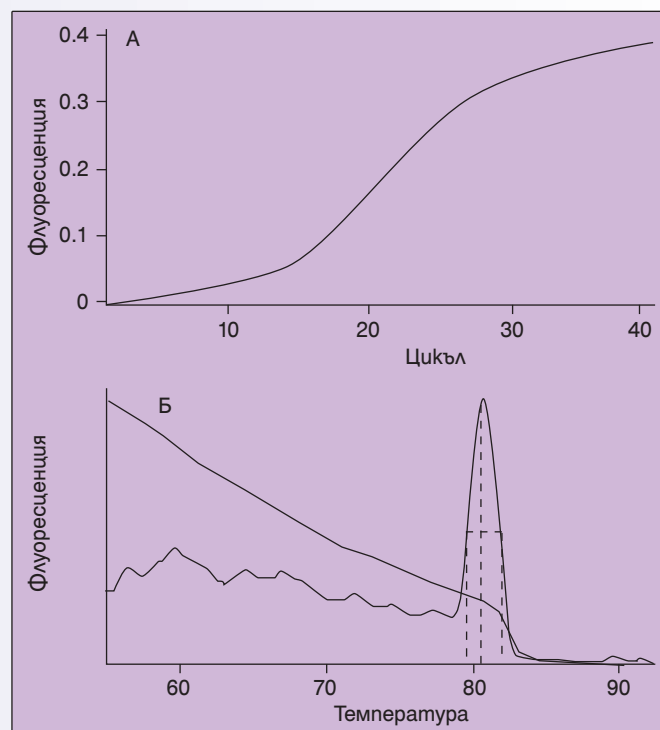
ELISA за откриване на специфични антитела от класове ИгМ и ИгГ срещу вируса на ККХТ се проведе чрез стандартен kit Vectocritean-CHF-IgM и IgG. Обработката на серумите, участващи в реакцията, се извърши при спазване на указанията на производителя. Прилаганият специфичен антиген в имуносорбентния тест

е инактивиран и концентриран. Комплексът „антиген-антитяло“ се визуализираше с помощта на хряново-пероксидазни конюгати. Стойностите в пробите под 0.9 бяха отчитани като негативни; стойности в рамките на 0.9–1.1 бяха отчитани като гранични, а тези над 1.1 приемахме за позитивни.

Резултати и обсъждане

От събраните и изследвани общо 68 проби от пациенти извършихме анализи на 43 серумни и 25 кръвни проби от пациенти с анамнеза и статус съмнителни за инфекция с вируса на ККХТ – неизяснен фебрилен синдром, токсиинфекциозен и/или хеморагичен синдроми, развили се след контакт с кърлеж или съмнение за такъв.

За да въведем в лабораторната ни практика детекцията и анализа на вируса на ККХТ с помощта на технологията real-time RT-PCR, ние използвахме праимерните системи F2-R3 и положителна контрола (вирусен щам V 42/81) намерени за ефективни при конвенционалните варианти на RT-PCR.^{7, 8} Тъй, като провеждането и отчитането на реакциите при real-time RT-PCR се отличава от това при конвенционалния PCR, ние изпробвахме и оптимизирахме различни амплификационни програми с помощта на SYBR® Green I real-time RT-PCR.



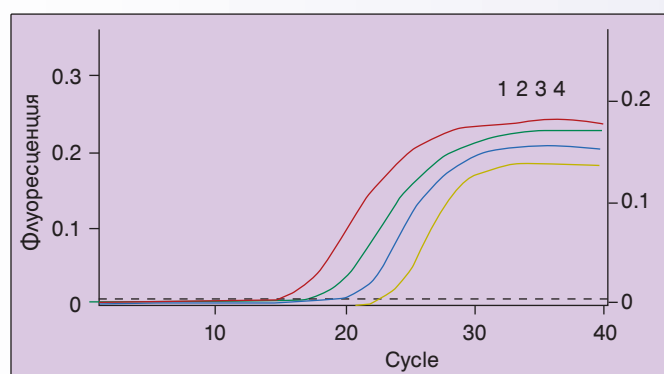
Фиг. 1. Real-time RT-PCR за детекцията и анализа на вируса на ККХТ с помощта на праимерните системи F2-R3. (А) Пропорционално нарастване на флуоресцентното излъчване по време на амплификация на образувания ампликон от лаб. No.V 42/81. Представена е детекцията на малкия S сегмент от вируса на ККХТ в контролната проба; (Б) Специфичност на амплификационния продукт от вируса на ККХТ. Специфичността на амплификационния продукт бе установена чрез анализ на кривата на топене. T_m на специфичния 534-базов PCR продукт бе 82°C, което съответства на предварително установената температура на топене

Получените резултати показват, че за оптимално функциониране на системата и качествена визуализация на продукта от съществено значение са изходното количество на изследваната РНК, работната концентрация на праймерите и наличието на активационно стъпало за ензима Taq-полимераза. Всички експерименти бяха провеждани 3-кратно при едни и същи условия, за да докажем възпроизводимост на резултатите. Оптимизираните протоколи за real-time RT-PCR на праймерната система F2-R3 са посочени на съответните фигури (фиг. 1 А–Б).

SYBR® Green I real-time RT-PCR за количествена оценка на вируса на ККХТ

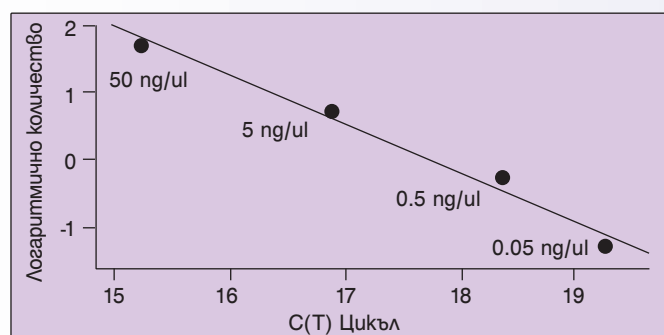
За да изследваме праговата чувствителност на реакцията, ние приготвихме последователни 4-кратни разреждания на тотално екстрахирана вирусна РНК (от 50 ng/μl до 0.05 ng/μl) от хомогенизирани суспензии на мозъци от новородени бели мишлета, заразени с вируса на ККХТ и служещи за положителната контрола. Визуализацията на получените амплификационни продукти е показана на фиг. 3.

Използвайки резултатите от предходните ни изследвания, ние разработихме real-time RT-PCR за определяне на нивото на антигенемия на вируса на ККХТ (концен-



Фиг. 3. Прагова чувствителност на real-time RT-PCR.

Флуоресцентни криви, получени при изследване на серийни разреждания на РНК (1–50 ng/μl; 2–5 ng/μl; 3–0.5 ng/μl; 4–0.05 ng/μl), екстрахирана от положителната контрола V42/81. Наблюдава се постепенно покачване на флуоресценцията в зависимост от първоначалната концентрация на РНК



Фиг. 4. Стандартна регресионна права, изразена като логаритъм от концентрацията на вирусна РНК от контролна проба V42/81 спрямо праговия цикъл (Ct value). Регресионният коефициент беше определен като $r^2=0.984$

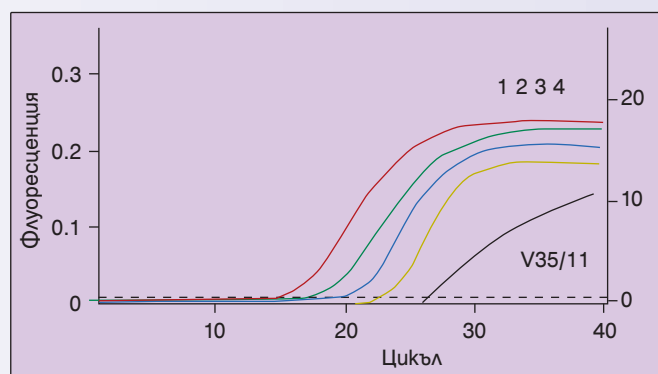
трация на вирусна нуклеинова киселина (РНК) в определено количество (140 μl) от изследваният клиничен материал). За целта построихме стандартна регресионна права (фиг. 4), върху която интерполирахме резултатите от изследванията на различни клинични материали.

Практическата проверка на ефективността на разработените стандартни криви беше извършена с помощта на различни ретроспективни клинични проби, предварително уточнени, че са положителни за вируса на ККХТ.

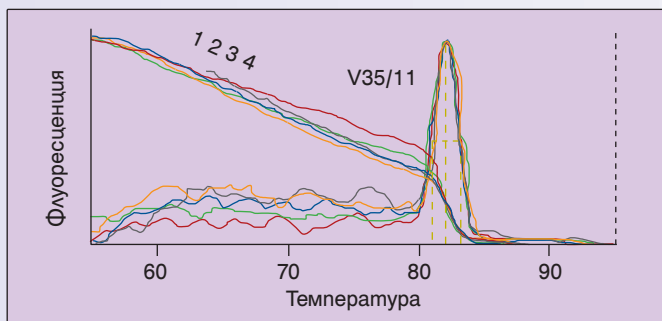
Разработените и оптимизирани молекулярни методи и средства за диагностика на ККХТ ни дадоха възможност да проведем прецизни изследвания върху съмнителните пациенти с цел доказване или отхвърляне на диагнозата. В сравнение с конвенционалния RT-PCR, времето за цялостния анализ на вируса на ККХТ с real-time RT-PCR намалява значително, поради отпадане на процедурите по визуализация на продуктите.¹⁰ Безспорно предимство е и по-специфичният анализ на продуктите с помощта на melt analysis, който предлага SYBR® Green I.

Резултатите от експериментално изследване за нивото на антигенемия на вируса на ККХТ в клинични проби, проведено с изготвените от нас количествени стандарти, бе извършено в общо 68 проби от пациенти с анамнеза и статус съмнителни за инфекция с вируса на ККХТ. От фиг. 5, 6 и 7 става ясно, че използваният едностъпков Real-time за детекция и доказване на вируса на ККХТ е бърз, специфичен и чувствителен молекулярен метод.

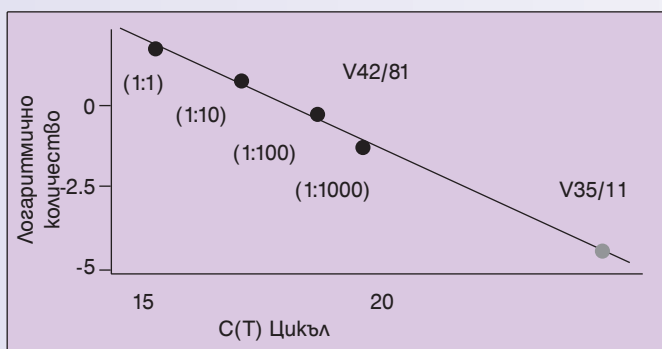
Информацията, получена по този начин, бе полезна както за изясняване на моментното състояние на инфекцията (концентрация на вирусна нуклеинова киселина (РНК) в кръвта от пациента), така и за прогнозиране на нейния ход. От фиг. 7 става ясно, че намерената концентрация вирус на пациент с Лаб. No. V 35/11 (потвърден за инфекция с ККХТ) остава далеч от стандартна регресионна права на използваните контроли. Клиничният ход на заболяването също потвърди лабораторната находка – лека форма на ККХТ.



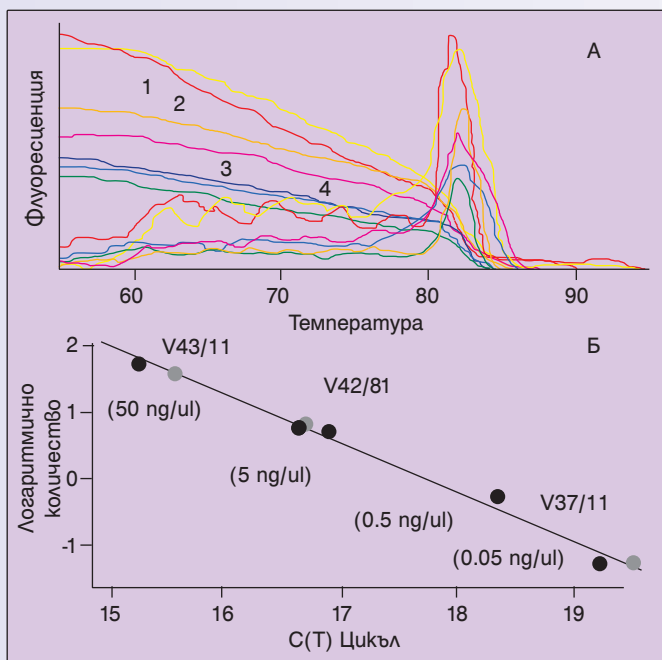
Фиг. 5. Real-time RT-PCR за детекцията и анализа на вируса на ККХТ. Флуоресцентни криви на положителни клинични материали. Представена е детекцията и сравнението на флуоресцентни криви, получени при изследване на серийни разреждания от положителна контрола V 42/81 (1, 2, 3, 4) със секвенции от вируса на ККХТ, izolиран от получени клиничен материал (кръв) на лаб. No. V 35/11



Фиг. 6. Real-time RT-PCR за детекцията и анализа на вируса на ККХТ. Специфичност на амплификационните продукти чрез анализ на кривата на топене (melting curve analysis). Амплификационни продукти на серийни разреждания от положителна контрола V 42/81 (1, 2, 3, 4) напълно съвпадат с лаб. No. V 35/11, което потвърждава диагнозата ККХТ при този пациент



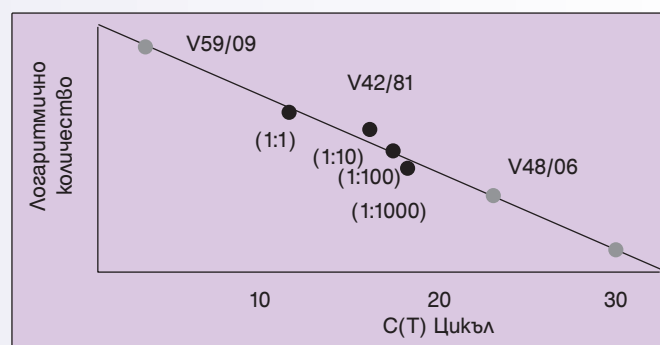
Фиг. 7. Стандартна регресионна права, изразена като логаритъм от концентрацията на контролната вирусна РНК (V 42/81) и лаб. No. V 35/11 спрямо праговия цикъл (Ct value)



Фиг. 8. Real-time RT-PCR за детекцията и анализа на вируса на ККХТ. (А) Специфичност на амплификационните продукти V 37/11, V 40/11, V 43/11 след сравнение на интензитетите им спрямо стандартните контроли (V 42/81–1, 2, 3, 4). (Б) Стандартна регресионна права, изразена като логаритъм от концентрацията на контролната вирусна РНК (V 42/81–50 ng/μl; 5 ng/μl; 0.5 ng/μl; 0.05 ng/μl) и лаб. No. V 37/11, V 40/11 и V 43/11 спрямо праговия цикъл (Ct value)

В групи клинични проби (V 37/11, V 40/11, V 43/11), със съмнение за вирусна хеморагична треска, получените резултати потвърждават времето в изследваните материали (фиг. 8-А). Тук също се създава възможност за определяне на клиничната форма на заболяването. От фигурите става ясно, че пациентът V 43/11 остава близо до стандартната проба с най-висока концентрация (фиг. 8-Б). Същевременно този пациент е с най-тежък ход на заболяването и с ясно изявен токсикоинфекциозен, кранеофарингеален синдром, тежка тромбоцитопения, петехии по предни и задни аксиларни линии. Останалите двама V 37/11 и V 40/11 остават между стандартните проби с по-ниска концентрация на положителната контрола, а след обсъждане на състоянието им с лекуващите лекари става ясно, че ходът на заболяването е благоприятен и се очаква пациентите да бъдат изписани скоро в добро общо състояние и без усложнения (фиг. 8 А–Б).

Ефективността на стандартните криви беше извършена с помощта на различни ретроспективни клинични проби, намерени за положителни за вируса на ККХТ през 2006 и 2009 г. След приложението на стандартната регресионна права и сравнението ѝ с положителните проби бе установено първоначалното ниво на антигенемия при тези пациенти. Анализирайки описаната клинична картина и съпоставяйки я с количествените характеристики, причинени от вируса на ККХТ с помощта на Real-time RT-PCR, ние успяхме да преценим чрез лабораторните резултати вече познатия изход от заболяването. Намерената концентрация вирус на пациент V 48/06 попадна под стандартната контролна крива заедно с настоящия пациент V 35/11 от 2011 г. (фиг. 9). Описаната клинична картина и при двата пациента бе средно тежка: неразположение, отпадналост, главоболие, втрисане, болки в мускулите, температура 39–40°C, гагене, повръщане, адинамия, кървене от венците. Намерената вирусна концентрация при пациент V 59/09 обаче попадна над стандартната контролна крива (фиг. 9). Клинично тук бе описана фулминантна форма на инфекция с ККХТ с тежко протичане и летален изход на заболяването.



Фиг. 9. Стандартна регресионна права, изразена като логаритъм от концентрацията на контролната вирусна РНК (V 42/81) и лаб. No. V 59/09, V 48/06 и V 35/11 спрямо праговия цикъл (Ct value)

Паралелно на вирусологичните изследвания бяха проведени и серологични изследвания на пациентите с неяснен фебрилен синдром с цел откриване на специфични антитела от клас IgM и IgG срещу вируса на ККХТ чрез стандартен ELISA kit. Провеждането на теста показва общо 10 позитивни реакции за IgG антитела. Намерените за положителни 5 серумни проби с IgM антитела напълно съвпаднаха с положителните резултати от полимеразната верижна реакция, изработени преди имуносорбентния тест. Положителните резултати се отнесоха към: 7 пациенти, съмнителни за ККХТ след анамнеза за контакт с кърлежи и неясен фебрилен синдром; 6 пациенти, ваксинирани и реваксинирани срещу ваксината на ККХТ; и 2 пациента, преболели заболяването.

Вярваме, че резултатите, постигнати при тази разработка, допринасят за изясняване на патогенетичния потенциал на вируса на ККХТ, като това не би могло да бъде изпълнено без оптимизирането на молекулярни методи и средства за диагностика в тази област. Във връзка с това усвоихме и внедрихме в практическата си

дейност полимеразната верижна реакция в реално време, като я използвахме за поставяне на окончателната диагноза при съмнителни болни. Също така, разработването на стандартна регресионна права, изразена като логаритъм от концентрацията на контролната вирусна РНК от ККХТ с характер на определяне на първоначалното ниво на антигенемия, даде възможност да се съпостави количеството антигени (специфична вирусна РНК) в кръвотока с тежестта на протичане на това заболяване.

Благодарности

Авторите благодарят за огромното сътрудничество на колегите от ИО МБАЛ „Пазарджик“; ИО МБАЛ „Д-р Атанас Дафовски“, Кърджали; ИО МБАЛ „Св. Пантелей“, Ямбол.

Настоящите изследвания са финансирани от Медицински Университет – София с конкурсното проектно финансиране на договор № 43, проект № 35 от Грант 2010.

Литература

1. Диков И. (1998) Вирусни хеморагични трески – Кримска хеморагична треска В кн: Инфекциозни болести (п/р И. Диков), Знание ЕООД, 150–152.
2. Кълвачев Н., Христова И. (2009) Кримска-Конго хеморагична треска. *Инфектология* 56 (1):4–6.
3. МонеВ В. (2002) Кримска-Конго хеморагична треска – история, епидемиология, природна огнищност, профилактика и борба В монографията „Актуални природно-огнищни инфекции в България“, под ред. Л. Ангелов, Пловдив, ИК-ВАП, 13–40.
4. МонеВ В., Диков И., Камаринчев Б. (2005) Кримска-Конго хеморагична треска. В кн: Арбовирусни инфекции. Вирусни хеморагични трески и биотероризъм (п/р В. Сербезов, З. Кълвачев); В. Търново, HMI Ltd. 2005; 130–142.
5. Christova I., Di Caro A., Papa A., Castilletti C., Andonova L., Kalvatchev N., Papadimitriou E., Carletti F., Mohareb E., Capobianchi M., Ippolito G., Rezza G. (2009) Crimean-Congo haemorrhagic fever, Southwestern Bulgaria Emer. *Infect Diseases* Vol.15, 2009; 983–985.
6. European Centre on Disease Prevention and Control. Meeting report: Consultation on Crimean-Congo haemorrhagic fever prevention and control. Stockholm, September 2008. http://ecdc.europa.eu/en/files/pdf/Publications/CCHF_meeting_report.pdf
7. Kalvatchev N., Christova I. (2008) One step RT-PCR for rapid detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 22/2008/3, 864–866.
8. Papa A., Bino S., Lagami A., Brahimaj B., Papadimitriou E., Pavlidou V., Velo E., Cahani G., Hajdini M., Pilaca A., Harxhi A., Antoniadis A. (2002) Crimean-Congo hemorrhagic fever in Albania, 2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21, 2002; 603–606.
9. Papa A., Maltezou C., Tsiodras S., Dalla G., Papadimitriou T., Pierrotsakos N. (2008). A case of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece, June 2008. *Euro Surveill* 13 (33), 2008; pii:18952.
10. Ririe M., Rasmussen P., Wittwer T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245:154–160.