

ARTÍCULO ORIGINAL

Desarrollo de un servicio comercial de diagnóstico molecular de enfermedades en pollos de granja (*Gallus gallus*)

Development of a commercial molecular diagnosis for disease in chickens (*Gallus gallus*)

Marisol Campero M.¹, Zulema Bustamante G.¹, Silene Veramendi T.², Jorge Rojas B.²

¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

²Laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática PROINPA. Cochabamba, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Marisol Campero Montaña. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

Teléfonos: 79377447, 4408474, 4577455

E mail: yazid_sol@hotmail.com

Recibido para publicación en 27/01/11

Aceptado en 18/06/11

RESUMEN

La producción de pollos de granja es una de las actividades más difundidas en el departamento de Cochabamba-Bolivia, donde los productores se encuentran permanentemente frente a grandes desafíos cómo la aparición de nuevas enfermedades como la micoplasmosis causada por *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*. La micoplasmosis causa grandes pérdidas económicas debido a que esta enfermedad se propaga muy rápido. Hoy en día el diagnóstico de estos patógenos se realiza por métodos serológicos, sin embargo, estas técnicas consumen mucho tiempo y a veces conducen a identificaciones erróneas. Las técnicas moleculares basadas en PCR en tiempo real son más ventajosas que las técnicas serológicas, ya que son rápidas, sensibles y específicas. Además pueden ser económicas en el análisis de diversos patógenos en un único ensayo (PCR multiplex). En este estudio se compararon los diferentes métodos para el diagnóstico molecular de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* a fin de establecer un servicio comercial. Para realizar este trabajo, se utilizaron muestras de hisopado traqueal, tomadas de las vías respiratorias. Se extrajo ADN por tres métodos (kit de extracción Mini Qiam ADN de la firma Qiagen, método de choque térmico y método convencional con buffer de lisis) y luego fueron analizados por un kit comercial (Isi TaqVet) y el uso de un kit de diagnóstico molecular desarrollado en este estudio. El método de extracción con un buffer de lisis, junto con el kit de diagnóstico molecular desarrollado

en este estudio generó resultados óptimos es decir se demostró mejor especificidad, sensibilidad y bajo costo.

Palabras Clave: PCR en tiempo real, Taqman, SyberGreen, diagnóstico, Mycoplasma.

ABSTRACT

Poultry breeding is one of the most widespread activity in the department of Cochabamba- Bolivia, where producers are permanently facing major challenges as the emergence of new diseases like mycoplasmosis caused by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Mycoplasmosis causes significant economic losses because this disease spreads very fast. Today the diagnosis of these pathogens is performed by serological methods; however, these techniques are time consuming and sometimes lead to misidentifications. Molecular techniques based on real-time PCR are more advantageous than serological techniques as they are rapid, sensitive and specific. Moreover they can be less expensive when analyzing various pathogens in a single assay (multiplex PCR). The aim of this study was to compare the different methods for molecular diagnosis of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* to establish a commercial service. To achieve this goal, we used tracheal swab samples obtained from the airways. DNA was extracted by three methods (kit DNA extraction Mini signature Qiam Qiagen, heat shock method and conventional method of lysis buffer) and then the samples were analyzed by a commercial kit (LSI TaqVet) and by a molecular diagnostic kit developed in

this study. The method of extraction with a lysis buffer together with the molecular diagnostic kit developed in this study generated the best results and demonstrated better specificity, sensitivity and low cost for the molecular diagnosis of avian mycoplasmosis.

Key Words: Real-time PCR, Taqman, SyberGreen, diagnostic, Mycoplasma

INTRODUCCIÓN

Cochabamba es uno de los departamentos donde la producción avícola es una de las más difundidas e importantes. El productor avícola frecuentemente se enfrenta a la aparición y difusión de enfermedades, entre éstas Mycoplasmosis aviar. Esta es una enfermedad respiratoria que provoca pérdidas económicas significativas en las granjas avícolas de Cochabamba.

La Mycoplasmosis aviar se detecta clásicamente mediante métodos serológicos, pero dichos métodos no presentan una alta especificidad y sensibilidad. También se requiere que la enfermedad evolucione para ser detectada, es decir que con las pruebas serológicas no se puede detectar Mycoplasmosis aviar en la etapa de incubación de dicha enfermedad. Otra desventaja de dichas pruebas es la presencia de falsos negativos o falsos positivos.^{1,2}

El diagnóstico molecular es un método de detección de enfermedades, que permite identificar el agente patógeno con criterios genotípicos. El mismo, permite un diagnóstico precoz de las enfermedades, pudiendo realizarse una detección pre sintomática, proporcionando de esta manera beneficios múltiples para el paciente.³

La PCR en tiempo real tiene varias ventajas sobre el método clásico serológico. Es una técnica más sensible porque permite procesar muestras biológicas muy pequeñas, con una especificidad elevada ya que detecta secuencias genéticas presentes en el patógeno y es rápida dado que la amplificación y la detección se producen en el mismo tubo de reacción, sin precisarse ninguna manipulación posterior que pueda contaminar la muestra.^{4,5,6}

El objetivo de esta investigación es desarrollar un servicio comercial de diagnóstico molecular mediante PCR en tiempo real para Mycoplasmosis aviar adaptando un método de extracción convencional y desarrollando un kit de diagnóstico molecular propio y reduciendo de esta manera los costos en pruebas moleculares por la técnica PCR en tiempo real.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestra para la extracción de ADN bacteriano. Las muestras se tomaron de dos granjas de pollos (1 y 2) ubicadas en el departamento de

Cochabamba, provincia Cercado a 2.558 metros sobre el nivel del mar.

La población fue escogida en función al diagnóstico presuntivo.

Para la toma de muestras se utilizaron hisopos estériles, dichos hisopos fueron introducidos en la tráquea del pollo hasta ser completamente embebidos de secreción traqueal y después fueron depositados en 1 ml de solución PBS para la conservación de la muestra hasta su posterior proceso.

Antes del proceso de extracción se realizó un paso previo que es la preparación de muestras, en esta etapa se centrifugaron las muestras a 10000 rpm, para asegurar que estén libres completamente del hisopo y luego se retiran los hisopos, dejando en los tubos sólo la muestra.

Después se agruparon las muestras de esta manera: se sacó un alícuota de 1 ml de cada tubo para formar el pool de 30 muestras y este pool fue procesado como si fuese una sola muestra y para la extracción por los diferentes métodos se sacó un alícuota de 600 µl o 1 ml del pool de 30 muestras, la cantidad depende del método de extracción a usar.

Extracción de ADN bacteriano por el kit comercial Mini Qiamp ADN de la firma Qiagen. A partir del pool de 30 muestras se toma una alícuota de 600 µl, a partir de la cual se ha extraído ADN bacteriano utilizando el kit Mini Qiamp ADN de la firma Qiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante (Handobook Quiagen).

Extracción de ADN bacteriano por choque térmico. Del pool de 30 muestras se retiró una alícuota de 1 ml de muestra, se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos. Se lavó el pellet tres veces con 1 ml de PBS, se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm. Tras el último lavado se re suspendió el pellet en 25 µl de PBS, se sometió a un choque térmico: 10 minutos a 100 °C y 10 minutos en hielo. Por último se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm, pasando el sobrenadante a otro tubo. En este se encuentra el ADN preparado listo para su estudio⁷

Extracción de ADN bacteriano por el método clásico utilizando un buffer de lisis. Del pool de 30 muestras se tomó un alícuota de 1,5 ml. Se siguió el protocolo de extracción de ADN bacteriano descrito por Zacco⁸, al cual se realizó modificaciones en la cantidad de los reactivos a usar, adaptándolas al volumen de muestra. En el protocolo original el volumen de muestra era de 50 ml; entonces los reactivos estuvieron en función a este volumen, por ejemplo para el primer reactivo que es el buffer de lisis, se utilizó 10 ml. En el protocolo modificado, el volumen de muestra fue de 1.5 ml y la cantidad de buffer de lisis a usar es de 800 µl.

Amplificación y detección del ADN bacteriano con el sistema TAQMAN. Para la detección simultánea de estos dos patógenos se utilizó el kit Multiplex Aviar

Mycoplasma de la firma LSI TaqVet siguiendo el protocolo de amplificación descrito por el fabricante (LSI TaqVet).

Selección de iniciadores que van a ser usados en la elaboración del kit de diagnóstico molecular de

PROINPA. Para la selección de iniciadores se realizó una revisión bibliográfica de trabajos de investigación.

La secuencia de los cebadores utilizados en este trabajo se encuentra en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de cebadores para *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*⁵

Patógeno a ser detectado	Región genómica a detectar	Número de acceso en el Gen Bank de secuencias	Secuencia del cebador directo (5'-3')	Secuencia del cebador reverso (5'-3')
Mg	mgc2	AE015450	Ttgggttagggattgggatt	ccaagggattcaaccatctt
Ms	16S-23S rDNA ISR	AY768810	Ctaaatacaatagccaaggcaa	cctccttcttacggagtaca

Amplificación por PCR en tiempo real usando el sistema Syber Green con el kit de diagnóstico molecular de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* elaborado por el laboratorio de Biología Molecular PROINPA. La amplificación por PCR en tiempo real usando el fluorocromo SYBR Green se realizó con 5 µl de ADN molde y un volumen final de reacción de 15 µl. Los diferentes reactivos se prepararon en dos soluciones diferentes, que fueron preparadas para la detección simultánea de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

Para el análisis de las curvas de disociación, se añadió un ciclo en el que tiene lugar un incremento paulatino de temperatura desde 55 a 90 °C, durante 35 min.

RESULTADOS

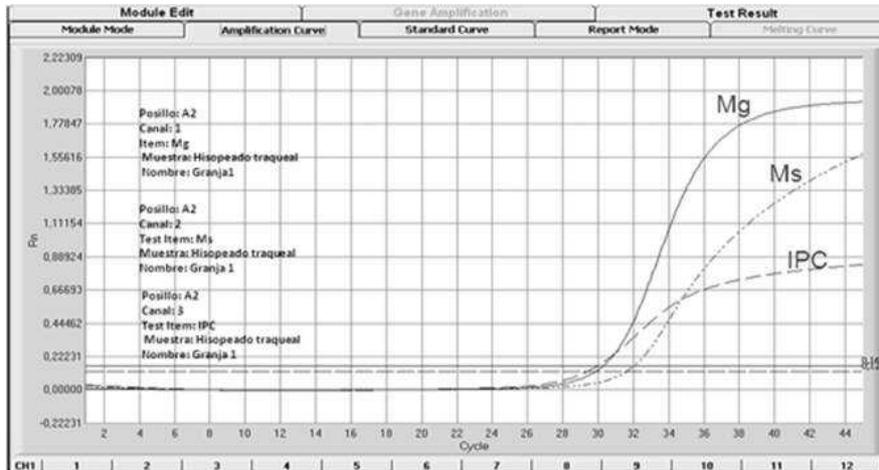
Sistemas de extracción 1: Extracción de ADN bacteriano mediante el kit Mini Qiap ADN de la firma Qiagen y amplificación – detección por el kit

Multiplex Aviar *Mycoplasma* de la firma LSI TaqVet. En la Fotografía 1 se muestra la curva de amplificación *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms) de la granja 1 y en la Fotografía 2, se muestra la curva de amplificación de la granja 2.

También se observó la amplificación de una curva que corresponde al control positivo interno (IPC), con este control se verificó que la extracción fue eficaz.

Se observó también una línea recta horizontal donde se encuentra el punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral, denominada Ct (*Threshold Cycle*). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral.

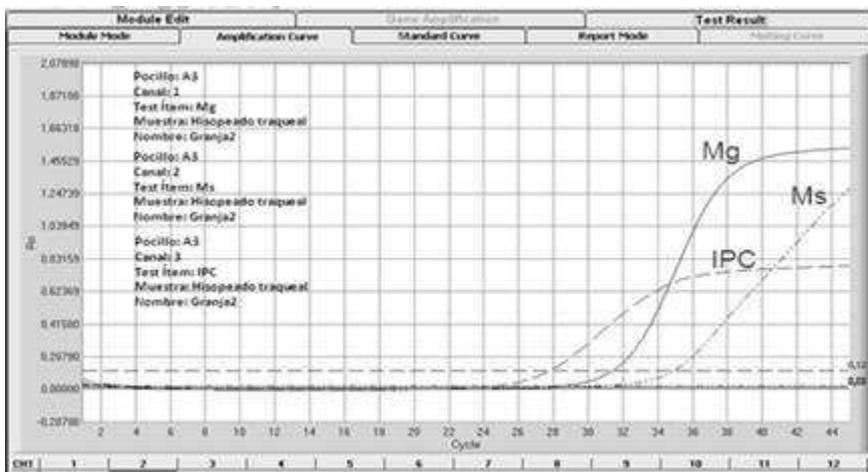
En la Fotografía 1 se observó que para *Mycoplasma gallisepticum* se tiene un ct de 30,23 y para *Mycoplasma synoviae* un ct de 31,5. En la Fotografía 2 *Mycoplasma gallisepticum* presenta un ct 27,22 y *Mycoplasma synoviae* un ct de 31,10.



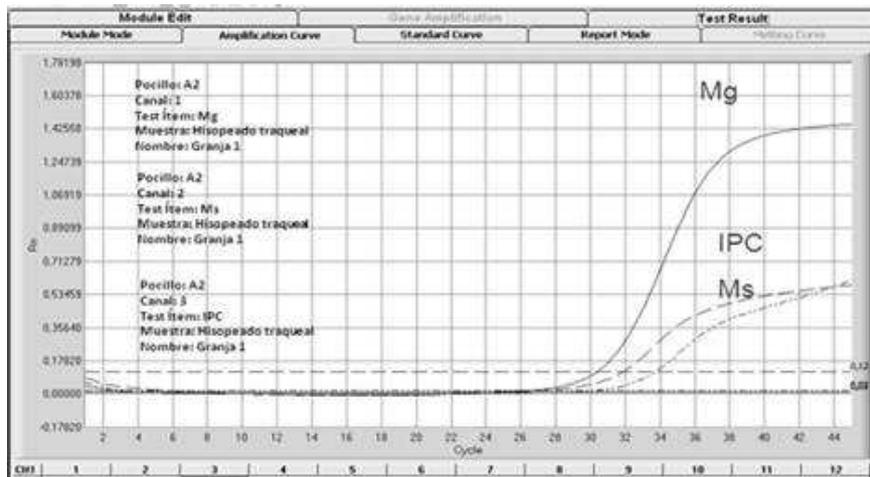
Fotografía 1. Resultados de la amplificación y detección de Mg y Ms utilizando un kit de extracción Qiagen y kit de detección LSI TAQVET de granja 1

Sistemas de extracción 2: Extracción de ADN bacteriano por choque térmico y amplificación – detección por el kit Multiplex Aviar Mycoplasma de la firma LSI TaqVet. En la Fotografía 3 se observó curvas de amplificación para *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms) de la granja 1 y en la Fotografía 4 se observó los resultados de la granja 2.

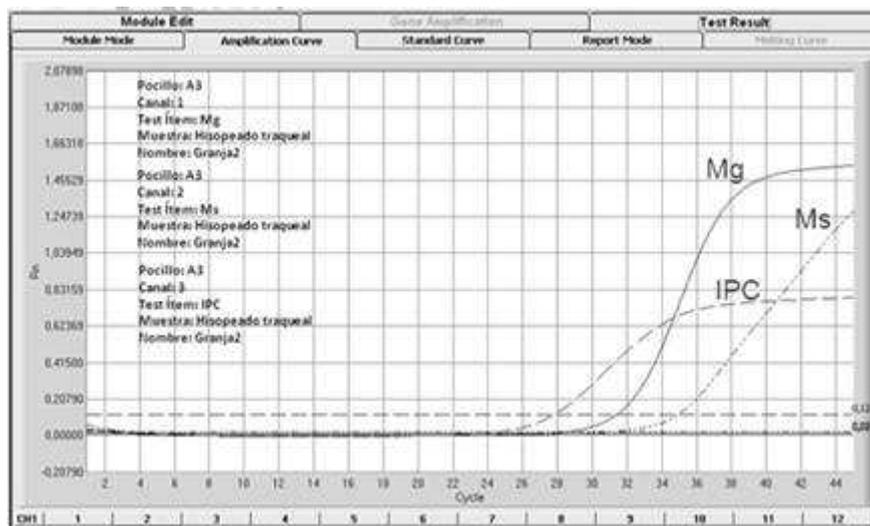
La eficacia de este método se puede verificar con la curva amplificada que corresponde al IPC (control positivo interno) ilustrada en las Fotografías 3 y 4. Se observaron en estas fotografías que en los pollos de granja 1 y granja 2, están presentes las bacterias *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.



Fotografía 2. Resultados de la amplificación y detección de Mg y Ms utilizando un kit de extracción Qiagen y kit de detección LSI TAQVET de granja 2



Fotografía 3. Resultados de la amplificación y detección de Mg y Ms utilizando el método de extracción choque térmico y kit de detección LSI TAQVET de granja 1

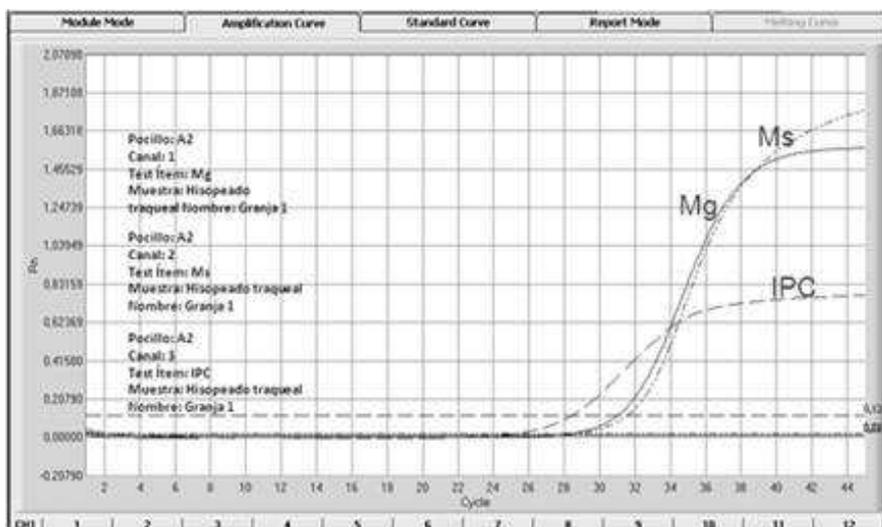


Fotografía 4. Resultados de la amplificación y detección de Mg y Ms utilizando el método de extracción choque térmico y kit de detección LSI TAQVET de granja 2

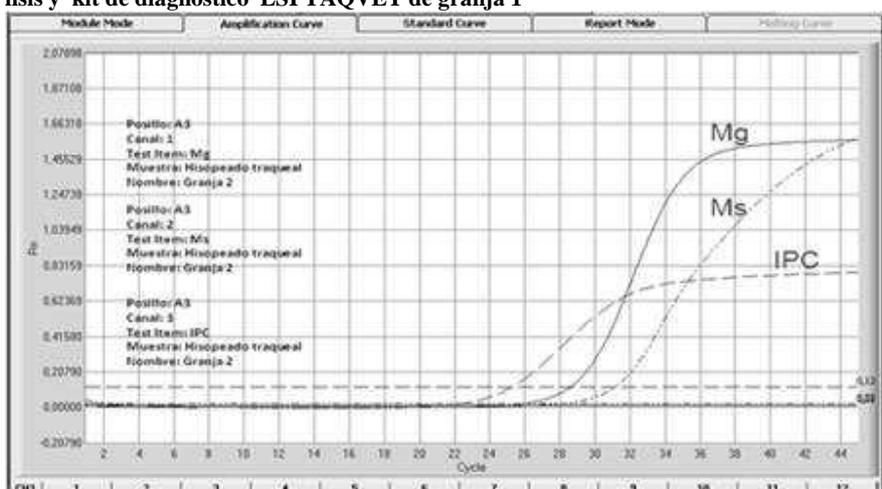
Sistemas de extracción 3: Extracción de ADN bacteriano mediante el método clásico usando un buffer de lisis y amplificación – detección por el kit Multiplex Aviar Micoplasma de la firma LSI TaqVet. La Fotografía 5 muestra la curva de amplificación *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms) de la granja 1 y la Fotografía 6 de la granja 2.

Este método demostró ser eficaz, lo cual se verificó con la amplificación del IPC que se observó en las Fotografías 5 y 6. En estas fotografías también se observaron la amplificación de las curvas que corresponden a las bacterias de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

No se observó diferencia gráfica con el método de extracción del kit comercial.



Fotografía 5. Resultados de la amplificación y detección de Mg y Ms utilizando el método de extracción clásico con buffer de lisis y kit de diagnóstico LSI TAQVET de granja 1



Fotografía 6. Resultados de la amplificación y detección de Mg y Ms utilizando el método de extracción clásico con buffer de lisis y kit de diagnóstico LSI TAQVET de granja 2.

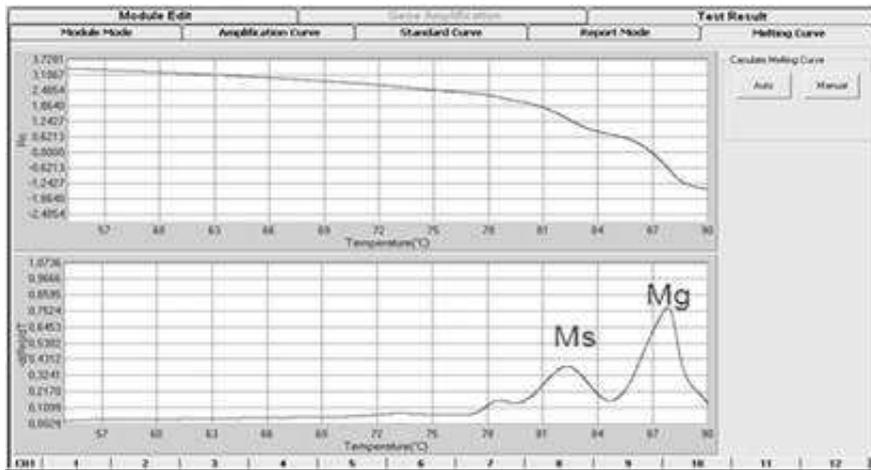
Detección simultánea de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* por PCR en tiempo real mediante el sistema Syber green utilizando un kit de diagnóstico molecular elaborado en el Laboratorio de Biología Molecular de PROINPA. En este ensayo se combinó dos pares de iniciadores (Mg y Ms) usando en el sistema Syber Green por la técnica PCR en tiempo real. SYBR Green actúa intercalándose a la doble hélice de ADN.

Se realizó el diagnóstico molecular de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* simultáneamente usando el kit elaborado

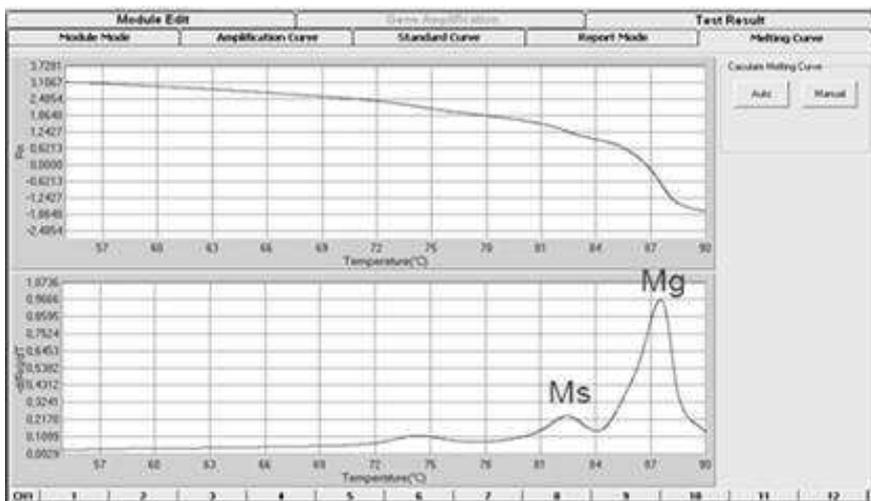
por el laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática PROINPA realizando las pruebas con los diferentes métodos de extracción.

Con el Kit de extracción Qiagen los resultados que se obtuvieron fueron favorables, y reproducibles con los resultados obtenidos con el sistema Taqman.

En la Fotografías 7 y 8 se observaron las curvas de disociación, que permiten diferenciar entre *M. gallisepticum* y *M. synoviae* en función a la temperatura de disociación (T_m).



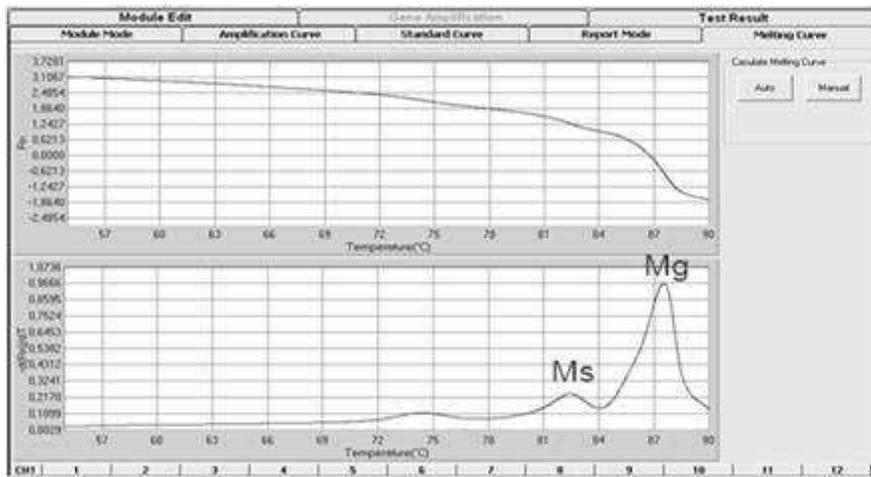
Fotografía 7. Curvas de fusión obtenidas utilizando el kit de extracción Qiagen y el kit de detección molecular elaborado por el laboratorio de Biología Molecular PROINPA de granja 1



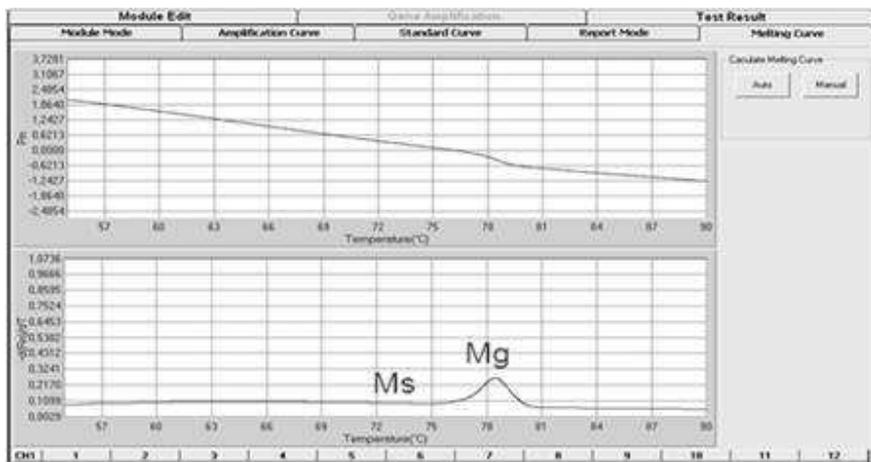
Fotografía 8. Curvas de disociación obtenidas utilizando el kit de extracción Qiagen y el kit de detección molecular elaborado por el laboratorio de Biología Molecular PROINPA de granja 2

Con el método de extracción choque térmico también se observó las curvas de amplificación en las Fotografías 9 y 10, pero en las curvas de disociación sólo se observó para *M. gallisepticum* tanto en la granja 1 como en la granja 2 y no se ilustra la curva de disociación para *M.*

synoviae, debido a que con el método extracción, el ADN obtenido no cuenta con la suficiente concentración para la detección molecular de Mycoplasmosis aviar usando el sistema Syber Green.



Fotografía 9. Curvas de disociación obtenidas utilizando el método de extracción choque térmico y el kit de detección molecular elaborado por el laboratorio de Biología Molecular PROINPA de granja 1

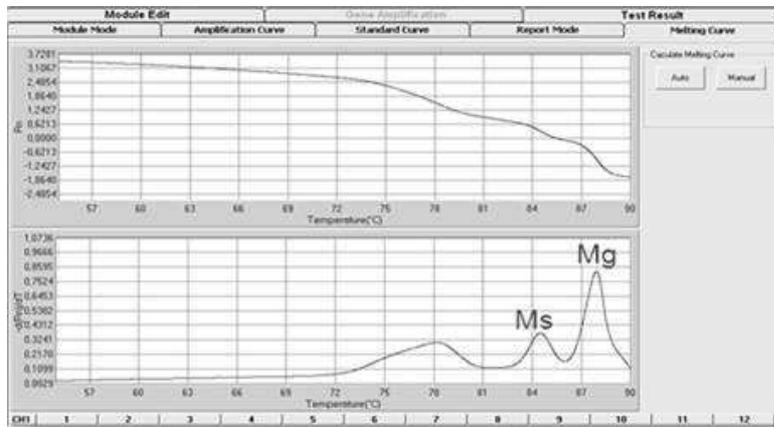


Fotografía 10. Curvas de obtenidas utilizando el método de extracción choque térmico y el kit de detección molecular elaborado por el laboratorio de Biología Molecular PROINPA de granja 2.

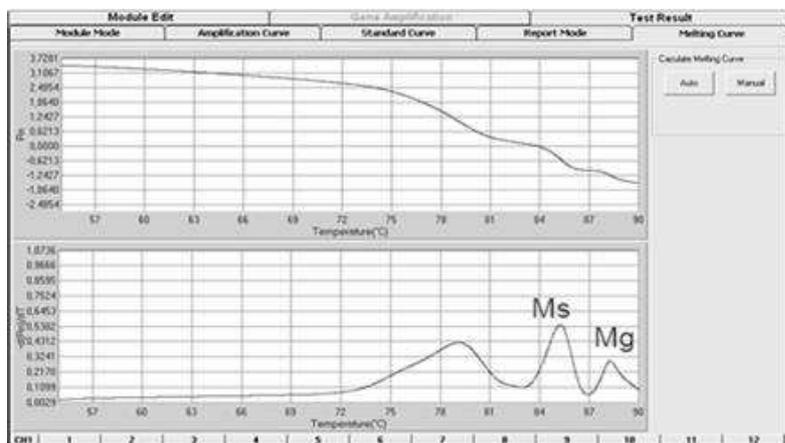
Las muestras de la granja 1 y 2 extraídas por el método convencional usando un buffer de lisis y procesadas por el kit elaborado en el laboratorio de Biología Molecular de PROINPA usando el sistema Syber Green dieron resultados positivos a *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

En las Fotografías 11 y 12 se observaron las curvas de disociación y una temperatura de disociación diferente tanto para *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

Este método de extracción resultó ser eficiente y específico para el diagnóstico molecular de Micoplasmosis aviar.



Fotografía 11. Curvas de disociación obtenidas utilizando el método de extracción clásico con buffer de lisis y el kit de detección molecular elaborado por el laboratorio de Biología Molecular PROINPA de granja 1



Fotografía 12. Curvas de disociación obtenidas utilizando el método de extracción clásico con buffer de lisis y el kit de detección molecular elaborado por el laboratorio de Biología Molecular PROINPA de granja 2

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos utilizando el kit comercial Qiagen mostraron que dicho kit es eficaz, lo cual se verifica con la amplificación de la curva del control positivo interno (IPC) ilustradas en las Fotografías 1 y 2. Otra ventaja de este kit es que el proceso de extracción es corto. La extracción de ADN por el kit Mini Quiamp ADN de la firma Qiagen es un método eficaz y presenta una sensibilidad cercana al 100 %¹⁰.

Con el método de extracción choque térmico se observaron que las curvas de amplificación no tienen diferencia gráfica comparando con las obtenidas por el kit.

Choque térmico es un método sencillo y el ADN obtenido por este método dio buenos resultados al ser usado por la técnica PCR en tiempo real⁷.

También se utilizó un método de extracción clásico utilizando un buffer de lisis. De esta forma se obtuvo buenos resultados, lo que se verificó gráficamente con las curvas amplificadas del IPC (control interno

positivo) y los patógenos Mg y Ms. El método clásico resultó ser eficaz, ya que el ADN extraído presenta una buena pureza con una relación A260/A280 igual 1.8⁹.

Los reactivos utilizados en el método de extracción convencional con un buffer de lisis no son de alto precio en comparación al Kit de extracción Mini Quiamp ADN de la firma Qiagen.

El sistema Taqman ha demostrado ser muy específico y sensible en la detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* como se observan en los resultados obtenidos usando los diferentes métodos de extracción y la aplicación del kit comercial (kit Multiplex Aviar Micoplasma de la firma LSI TaqVet)¹⁰.

La técnica PCR en tiempo real usando el sistema Taqman, presenta una alta especificidad ya que tiene una sonda interna, existe sensibilidad y reproducibilidad de los resultados verificándose con la detección de *M. gallisepticum* en muestras clínicas del tracto respiratorio^{1,10}.

Comparando los dos sistemas de PCR en tiempo real, los resultados obtenidos en este estudio muestran una

elevada equivalencia entre el sistema SYBR Green y el sistema TaqMan. Estos resultados coinciden con estudios recientes para la detección de *Staphylococcus aureus*^{11,12}, mientras que discrepan con los resultados de un estudio similar en el que se obtiene una mayor sensibilidad con el sistema TaqMan desarrollado para *Staphylococcus aureus* en queso⁹. Sin embargo encuentran más sensible el sistema de SYBR Green desarrollado para *Staphylococcus aureus* que el sistema TaqMan¹¹. Este caso podría deberse a la optimización de la reacción, puesto que el SYBR Green emite más fluorescencia por amplificado que las sondas TaqMan, por lo que el nivel umbral de fluorescencia se alcanza mucho antes obteniendo valores de CT menores. Así mismo, el sistema SYBR Green desarrollado por Fricker¹³ para cepas eméticas de *Bacillus cereus* resultó 10 veces más sensible que el sistema TaqMan, lo que podría explicarse por la influencia de utilizar diferentes oligonucleótidos para cada sistema.

En conclusión, el servicio comercial de diagnóstico molecular de enfermedades aviares perteneciente al laboratorio de Biología Molecular de la Fundación PROINPA, cuenta con tres métodos de extracción de ADN bacteriano, los cuales fueron optimizados para extraer un ADN de buena calidad que no presente problemas durante la amplificación de patógenos por la técnica PCR en tiempo real.

El método de Qiagen empleado para la extracción de ADN ha funcionado satisfactoriamente, sin necesidad de tratamientos previos, para la extracción de ADN de los patógenos *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

Entre los métodos convencionales probados, choque térmico es un método corto por PCR en tiempo real mediante el sistema Taqman los resultados fueron reproducibles a comparación de las muestras extraídas con el Kit comercial Qiagen. El sistema Syber green no presentó buenos resultados.

El método clásico resultó ser el mejor método utilizado en comparación a choque térmico y choque térmico con resina, tomando en cuenta: calidad de ADN, sensibilidad del método y costo del análisis molecular. Con las curvas amplificadas, se verificó que la calidad del ADN es similar a las extraídas por el kit comercial Qiagen.

Los dos sistemas empleados para la detección molecular de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, SYBR Green y TaqMan, ofrecen niveles similares de cuantificación y sensibilidad.

No obstante, se propone el sistema de SYBR Green desarrollado por el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación PROINPA que tienen un costo menor a comparación del sistema Taqman, lo que representa una ventaja en el análisis rutinario de un elevado número de muestras.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación PROINPA por el financiamiento de este trabajo; a la Facultad de Bioquímica y Farmacia.

REFERENCIAS

1. Raviv A Z. y Kleven S. The Development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Diseases*. 2008; 53.
2. Callison AS, M Riblet AS, Sun BN, Ikuta CDD, Hilt AV, Leiting ASH, Kleven AD y Suarez E. Development and validation of a real-time Taqman_Polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds. *Avian Diseases*. 2006; 50:537-544.
3. Oliva Virgili R. Genética Médica. 3^{ra} ed. Barcelona: Universitat; 2004.
4. Guarner C. Hepatitis C. Barcelona: Marge Books; 2007.
5. Prieto J. y Balcells A. La clínica y el laboratorio: Interpretación de análisis y pruebas funcionales. 20^{va} ed. España: Elsevier; 2007.
6. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínic in Provincial. 2004; 5.
7. Sánchez B, Redondo H, Brandy L, Martínez A. y Rodríguez M. J. Detección de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* por PCR a tiempo real sobre los genes *Lp* y *mgc2*, en swabs traqueales con PBS y medio frey. Roche. 2006; 28.
8. Zacco E, Pividori MI, Alegret S. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Analytical Chemistry*. 2006, 78:1780-8.
9. Alegret S. Diseño de nuevos materiales de afinidad universal aplicación de sensores. [Tesis de Posgrado]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2006.
10. Hein I, Lehner A, Rieck P, Klein K, Brandl E, y Wagner M. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(7): 3122-26.
11. Alarcón B, García-Cañas V, Cifuentes A, Gonzalez R, y Aznar R. Simultaneous and sensitive detection of three foodborne pathogens by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(23): 5180-6.
12. Liu Y, Cai X, Zhang X, Gao Q, Yang X, Zheng Z, Luo M, y Huang X. Real time PCR using TaqMan and SYBR green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Microbiol Meth*. 2006; 65: 21- 31.
13. Valasek M. y Repa J. The power of real-time PCR. *Advan Physiol Educ*. 2005; 29: 151 - 159.