

TÜBERKÜLOZ LENFADENİT OLGULARINDAN İZOLE EDİLEN MİKOBAKTERİLERİN İDENTİFİYE EDİLMESİ VE ANTİTÜBERKÜLOZ DUYARLILIKLARI

Gönül ASLAN*, **Gürol EMEKDAŞ***, **Duygu DÜŞMEZ APA****, **Ayça CORDAN YAZICI*****,
Ayşın KOKTÜRK***, **Gülden ERSÖZ******, **Murat ÜNAL*******, **Mahmut ÜLGER***

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

**Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, MERSİN

***Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, MERSİN

****Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, MERSİN

*****Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, MERSİN

ÖZET

Tüberküloz lenfadenit, ekstrapulmoner tüberkülozun en sık görülen klinik formudur ve en çok servikal bölge lenf bezlerini tutmaktadır. Gelişmiş ülkelerde özellikle çocuklarda Mycobacterium tuberculosis dışı mikobakteriler etken olarak daha fazla saptanırken, göçmenlerde ve gelişmekte olan ülkelerde M.tuberculosis en sık saptanan etkidir. Bu çalışmamızda tüberküloz lenfadenit şüphesi ile gönderilen biyopsi örneklerinden mikobakteri izolasyonuna bakteriyolojik yaklaşım, tanı ve tedavinin yönlendirilmesinde mikrobiyoloji laboratuvarının katkısının irdelenmesi amaçlanmıştır.

Tüberküloz lenfadenit şüpheli 22 biyopsi örneğinin homojenizasyon sonrası kültürü (Löwenstein-Jensen ve/veya BACTEC 12B) ve yayma preparatları yapılmıştır. Kültürde üreme gösteren örneklerin M.tuberculosis kompleks (MTC) ve nontuberculous mycobacteria (NTM) ayrımları p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofenon testi ve PCR RFLP yöntemi ile yapılmıştır. MTC üremesi belirlenen isolatların primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları belirlenmiştir. Yaşları 13-83 arasında dört kadın olguda ikisi MTC, ikisi NTM olmak üzere mikobakteri izolasyonu yapılmıştır. MTC suşları primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı bulunmuştur. NTM izole edilen olgulardan birine cerrahi tedavi, diğer olguya ise ilaç tedavisi uygulanmıştır.

Tüberküloz lenfadenit olgularında MTC yanı sıra NTM'in mutlaka düşünülmesi gerektiği, kültür ve identifikasyonunun yapılmasının tedaviyi yönlendirmede katkısının önemli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: lenfadenit, Mycobacterium tuberculosis, nontuberculous mycobacteria

SUMMARY

The Identification and Antituberculosis Susceptibility of Mycobacteria Isolated from Tuberculosis Lymphadenitis Cases

Tuberculosis lymphadenitis is the most commonly seen form of the extrapulmoner tuberculosis and usually invades the lymph nodules of cervical region. In the developed countries, especially in the children, mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis are much more etiological agents; on the other hand M.tuberculosis is common agent in the immigrant and developing countries. In this study we aimed to establish the contribution of microbiology laboratory to the bacteriologic approach, to the isolation of mycobacteria from tuberculosis lymphadenitis suspected biopsy materials and to the management of the treatment. After the homogenization of 22 biopsy materials with suspected lymphadenitis, culture (Löwenstein-Jensen and/or BACTEC 12B) and smears were made. The differentiation of M.tuberculosis complex (MTC) strains was made with p-nitro- α -acetyl amino- β -hydroxy-propiofenone test and PCR RFLP assay. The susceptibility of MTC isolates to primary anti-tuberculosis drugs was determined. From four women patients, age range 13-83, two MTC and two nontuberculous strains (NTM) were isolated. MTC strains were sensitive to primary anti-tuberculosis drugs. Surgical treatment was performed in one of NTM cases and drug treatment in other one. We reached to the conclusion that in the tuberculosis lymphadenitis cases NTM strains should be absolutely considered together with MTC strains and the culture and identification will be helpful in the management of treatment.

Keywords: lymphadenitis, Mycobacterium tuberculosis, nontuberculous mycobacteria

Yazışma adresi: Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

Tel.: (0324) 337 43 00/1151, (0532) 562 94 87

e-posta: drgaslan@gmail.com

Alındığı tarih: 09.01.2007, revizyon kabulü: 28.02.2007

GİRİŞ

Tüberküloz halen bir çok ülkeyi etkileyen en önemli halk sağlığı problemlerinin başında gelmektedir. Ekstrapulmoner tüberküloz, akciğerdeki tüberküloz basillerinin lenfohematojen yolla yayılmasıyla gelişmektedir. Ekstrapulmoner tüberküloz en sık lenf bezleri, plevra ve osteoartiküler sistemde görülmektedir. Lenfadenit ekstrapulmoner tüberkülozun en sık görülen klinik formudur ve en çok servikal bölge lenf bezlerini tutmaktadır. Gelişmiş ülkelerde özellikle çocuklarda *Mycobacterium tuberculosis* dışı mikobakteriler (NTM) etken olarak daha fazla saptanırken, göçmenlerde ve gelişmekte olan ülkelerde *M.tuberculosis* en sık saptanan etkenidir^(13,16).

Tüberküloz lenfadenit, ya primer tüberküloz döneminde (olguların % 5'inde 6 ay içinde, genelde çocuklarda), ya da primer infeksiyon döneminde lenfojen veya hematojen yolla lenf bezlerine yerleşen ve dormant basil olarak yaşamını sürdüren basillerin yıllar sonra (immün sistemin herhangi bir nedenle zayıflaması ile) çoğalarak hastalık oluşturması (endojen reaktivasyon) sonucu gelişmektedir^(8,10).

Lenf bezi tüberkülozu Hipokrat zamanından beri bilinmekte, Ortaçağda Avrupa'da hastalık halk arasında "kralın nazarı (King's evil)" olarak tanımlanmakta ve hastalığın ancak kralın soylu dokunuşu ile iyileşebileceğine inanıldığı belirtilmektedir. Hastalık Latince "scrofula" ya da "glandular swelling" olarak tanımlanmaktadır⁽¹³⁾.

Lenf bezi tüberkülozunun geleneksel kesin tanısı histopatolojik olarak ve aside dirençli basil (ARB) görülmesi veya *M.tuberculosis*'in üretilmesiyle konmaktadır. Son yıllarda eksizyonel biyopsi yerine daha az invaziv olan ince iğne aspirasyon örneklerinde inceleme yapılması önerilmektedir. Ekstrapulmoner tüberkülozuların sıra dışı klinik görünüşleri ve bakteriyolojik tanı yöntemlerinin yetersiz kalması tanıda güçlükler oluşturabilmektedir. Klinik örnekte ARB gösterilmesi basit ve hızlı bir yöntem olmasına rağmen duyarlılığı düşüktür. Tüberkülozda kesin tanı için kullanılan altın standart tanı yöntemi kültür, yüksek duyarlılık ve özgüllü-

ğe sahip olmasına rağmen sonuçlanması birkaç hafta gerektirmektedir. Son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) *M.tuberculosis*'in hızlı tanısında önerilmektedir⁽¹²⁾. Ancak PCR'daki standardizasyon sorunları nedeniyle bu konuda klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmamızda laboratuvarımıza tüberküloz lenfadenit şüphesi ile gönderilen biyopsi örneklerinden mikobakteri izolasyonuna bakteriyolojik yaklaşım, tanı ve tedavinin yönlendirilmesinde mikrobiyoloji laboratuvarının katkısının irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

2004-2006 yıllarında çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza tüberküloz lenfadenit şüphesi ile gönderilen 22 biyopsi örneği homojenizasyon sonrası Löwenstein-Jensen (LJ) ve/veya BACTEC 12B besiyerine ekilmiş ve yayma preparat hazırlanmıştır. Yayma preparatlar Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile boyanıp ARB pozitifliği yönünden değerlendirilmiştir. Kültürde üreme gösteren örnekler için *M.tuberculosis* kompleks (MTC) ve nontuberculous mycobacteria (NTM) ayrımı p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofenon (NAP) testi ve PCR RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemi ile yapılmıştır. MTC üremesi belirlenen izolata primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları BACTEC 460 TB sistemi ile yapılmıştır⁽¹⁴⁾.

PCR RFLP

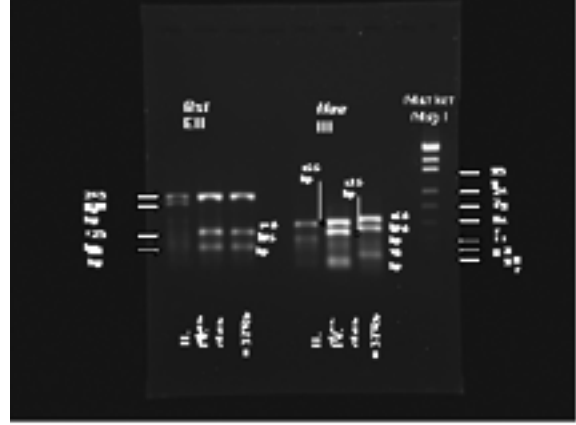
DNA ekstraksiyonu modifiye klasik fenol-kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir⁽⁶⁾. PCR ile mikobakterilerin ısı şok proteini (hsp 65), Tb 11 (5'-ACCAACGATGGTG-TGTCCAT) (MOLBIOL, Germany, 50 pM/ μ l), Tb 12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT) (MOLBIOL, Germany, 50 pM/ μ l) primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır⁽¹⁷⁾. Primerlerin çoğalttığı bölgede 439 bp'lik bant oluşan örnekler *Mycobacterium* spp. olarak tespit edilmiştir. Tiplendirme için Hae III (Sigma, Germany) ve BstE II (Sigma, Germany) enzimleri ile kesilerek oluşan bant uzunluklarının farklılıklarına göre mi-

kobakteri türü belirlenmiştir⁽⁷⁾.

BULGULAR

Ön tanıları tüberküloz lenfadenit ve deri tüberkülozu olan 22 olgudan alınan biyopsi örneklerinin 2'sinde EZN boyama yöntemi ile ARB pozitifliği, 4'ünde kültürde *Mycobacterium* spp. izole edilmiştir. *Mycobacterium* spp. izole edilen kültürlerden ve PCR-RFLP yöntemi ile yapılan identifikasyonda ikisinin MTC, ikisinin ise NTM olduğu tespit edilmiştir. NTM izolatlarının PCR RFLP sonrası jel görüntüleri şekilde izlenmektedir. MTC izolatları primer antitüberküloz ilaçlarına duyarlı olarak belirlenmiş ve ilaç tedavisi uygulanmıştır. NTM izolatlarından biri duyarlılık ve identifikasyon testine aynı anda alınmış ve süşun dirençli olduğu ve NTM olduğu saptanmıştır. Bu olguda örnek cerrahi ekzizyonel biyopsi şeklinde alındığından NTM olduğu bilinmeden cerrahi tedavi uygulanmıştır. NTM izolasyonu yapılan diğer olgu bakteriyolojik sonuçları almadan patoloji raporuna göre (lupus vulgaris) hemen primer antitüberküloz tedavisine alınmıştır. Hasta tedavi izlemi sıra-

sında kontrollere gelmemiş, hastaya ulaşılamamış, tedavi sonuçları ile ilgili bir değerlendirme yapılamamıştır. Olgularla ilgili ayrıntılı bilgi tabloda verilmiştir.



Şekil: NTM izolatlarının PCR RFLP sonrası jel görüntüleri.

TARTIŞMA

M.tuberculosis, konak-patojen ilişkilerini yönlendirilmesinde rol oynayan birçok yapısal komponentler içeren bir basildir. Basil her ge-

Tablo: *Mycobacterium* spp. izole edilen lenfadenit olgularının klinik ve laboratuvar bulguları.

	1. Olgu	2. Olgu	3. Olgu	4. Olgu
Yaş	83	13	25	42
Cinsiyet	Kadın	Kadın	Kadın	Kadın
Soygeçmiş	Özellik yok	Özellik yok	Babası tüberküloz	Özellik yok
Şikayeti	Boyun sağ yanında şişlik, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, yaygın vücut ağrısı, ateş	7-8 yıl önce sol yanakta minik sivilce şeklinde başlayan lezyon	Çene alt kısmında şişlik, ağrı	Boyunda ağrı, kitle
PPD	+ (14)	+ (10)	+ (16)	Yapılmadı
Müracaat ettiği bölüm	İnfeksiyon Hastalıkları	Dermatoloji	Dermatoloji	KBB
Ön tanı	Lenfadenit	Lenfadenit	Deri tüberkülozu	Periferik tüberküloz lenfadenopatisi
ARB	+	-	-	+
Kültür	+	+	+	+
Antitüberküloz ilaç duyarlılığı	HRSE duyarlı	-	HRSE duyarlı	HRSE dirençli
PCR	+	-	-	+
Histopatoloji	-	Nodüler dermatit, lupus vulgaris ile uyumlu	Kronik granülomatöz inflamasyon	Kazefiyeye granülomatöz inflamasyon
<i>hsp65</i> PCR RFLP				
BstEII	245/125/80	245/220	245/125/80	245/125/80
HaeIII	160/140/70	140/105	160/140/70	155/135
İdentifikasyon	MTC	M.avium	MTC	M.fortuitum ss.fortuitum
Tedavi	HRSE	HRZE	HRZE	Cerrahi

H: İzoniiasid, R: Rifampisin, S: Streptomisin, E:Etambutol, Z: Pirazinamid.

çen gün tıp dünyasını şaşırtmaya ve meşgul etmeye devam etmektedir^(5,15).

Ekstrapulmoner tüberküloz en sık lenf bezleri, plevra ve osteoartiküler sistemde görülmektedir^(1,13). Erişkinde tüberküloz lenfadenit genellikle akciğer tutulumu olmaksızın karşımıza çıkmaktadır. Tropikal ve subtropikal bölgelerde *M.tuberculosis*, Kuzey Avrupa'da *Mycobacterium bovis*, Asya'da sporadik olgular şeklinde BCG ve *Mycobacterium scrofulaceum* etken olarak bildirilmektedir⁽¹⁾. Çalışmamızda 2 olguda MTC, 2 olguda ise NTM izole edilmiştir. MTC izole edilen olguların tedavilerinde duyarlılık testi sonuçları beklenmeden primer antitüberküloz ilaçlar kullanılmıştır. Tanıda histopatolojik inceleme ve bakteriyolojik tanının uyumlu olduğu gözlenmiştir. Duyarlılık testi sonuçları bu iki MTC izolatının primer antitüberküloz ilaçlarına duyarlı olduğunu göstermiştir. NTM izolatlarından biri duyarlılık ve identifikasyon testine aynı anda alınmış ve suşun dirençli olduğu ve NTM olduğu saptanmıştır. Bu olguda örnek cerrahi eksizyonel biyopsi şeklinde alındığından cerrahi tedavi NTM olduğu bilinmeden uygulanmıştır. NTM izolasyonu yapılan diğer olgu bakteriyolojik sonuçları almadan patoloji raporuna göre (*lupus vulgaris*) hemen primer antitüberküloz tedavisine alınmıştır. Hasta tedavi izlemi sırasında kontrollere gelmemiş, hastaya ulaşamamış, tedavi sonuçları ile ilgili bir değerlendirme yapılamamıştır.

Klasik bakteriyolojik tanı yöntemlerinin (EZN ve kültür) yüksek özgüllüğüne (% 100) rağmen duyarlılığı EZN için % 10-77, kültür için ise % 20-81 arasında bildirilmektedir. Kültürde sıvı besiyeri kullanımının duyarlılığı artıracığı bildirilmektedir. Oranlar arasında bu kadar farklılıklar olması uygun örnek alımı, uygun taşınması, uygun işlem yapılması ile ilişkilendirilmektedir. Endemik bölgelerde ince iğne aspirasyon sitolojisinin duyarlılığı % 97-100, özgüllüğü % 88-100 arasında bildirilmektedir. Aljafari ve ark.⁽¹⁾ tarafından Sudan'da yapılan bir çalışmada ince iğne aspirasyon sitolojisi sonuçları ile PCR sonuçlarının korelasyon gösterdiği vurgulanmaktadır. Klinik şüpheli ince iğne aspirasyon sitolojisi negatif olgularda PCR'in tanı değerinin önemli olduğu bildirilmektedir⁽¹⁾. Gü-

nümüzde Food Drug Administration (FDA), ticari PCR sistemlerinden bir kaçına yalnızca ARB pozitif solunum örnekleri için onay vermiştir. Solunum örnekleri dışındaki materyaller % 20'lere ulaşan inhibitör ajanları içermesinden dolayı bu örnekler için önerilen standardize moleküler yöntem bulunmamaktadır. Avrupa'da 10'u negatif, 5'i 100 basil içeren, 5'i 1000 basil içeren 20 örnek 18 ayrı ülkede 30 merkezde moleküler yöntemlerle çalışılmış ve yalnızca 5 merkezde + ve - örneklerin tamamında doğru sonuç alınmıştır⁽¹¹⁾. Moleküler yöntemlerin kullanımı ile ilgili bu çarpıcı örnek standardizasyonun zorluğunu, yüksek duyarlılıkla ilgili verilerin yanı sıra Negatif prediktif değer ve Pozitif predikrif değerlerin değerlendirmeye alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Ülkemizde yapılan 636 olguluk bir çalışmada lenfadenit, ekstrapulmoner tüberkülozun en sık görülen şekli olarak bildirilmektedir⁽⁹⁾.

Tüberküloz lenfadenitlerin geleneksel tanı yöntemlerinden ince iğne aspirasyonunun sitolojik incelemesi ile tanının % 25-77 oranda konabildiği, duyarlılığının % 88, özgüllüğünün ise % 96 olduğu bildirilmektedir. Kültür yöntemi ile olguların % 10-69'unda üreme gözlenmektedir⁽⁴⁾.

Tüm ekstra pulmoner tüberküloz olguları gibi tüberküloz lenfadenit formlarının kadın cinsiyette fazla görüldüğü belirtilmektedir^(2,18). Literatürle uyumlu olarak olgularımızın da tümünün kadın olduğu gözlenmiştir. Ülkemizde tüberküloz lenfadenit ile ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır ve tür düzeyinde identifikasyon çoğunda yapılmadığından ülkemizde etken mikobakterilerin en sık hangisinin yaygın olduğu bilinmemektedir. Ancak tür düzeyinde identifikasyon hem tedavinin yönlendirilmesinde, hem de bölge ve ülke epidemiyolojisine katkıda bulunacaktır. Tüberküloz lenfadenit, diğer ekstrapulmoner tüberkülozlar gibi bir çok klinik tarafından takip edilmekte ve tanıda daha çok histopatolojik inceleme tercih edilmektedir. Bu da tür düzeyinde izolasyon ve identifikasyon yapılamamasına neden olmaktadır.

Tüberküloz lenfadenit tedavisinde 6-9 ay kombine primer antitüberküloz ilaçları veya

cerrahi tedavi uygulanmaktadır⁽³⁾.

Tüberküloz lenfadenit ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde hâlâ önemli bir sağlık sorunudur. Düşük sosyoekonomik düzey, eğitimsizlik ve kötü yaşam koşulları tüberkülozun bütün klinik formları gibi en başta tüberküloz lenfadenitin de artışından sorumludur. Bu nedenle sebebi bilinmeyen ateş ve lenfadenopati ayırıcı tanısında tüberküloz olabileceği hatırlanmalı, kesin tanı için klinik bulgular histopatolojik inceleme, bakteriyolojik tanı ile birlikte değerlendirilmelidir. Ayrıca lenfadenit etiyolojisinde NTM'in sıklıkla etken olduğu hatırlanmalı, tedavinin yönlendirilmesi için mutlaka izolatların identifikasyonu yapılmalıdır. NTM izolatları anti-tüberküloz ilaçlara dirençli olduğundan bu hastalarda genellikle cerrahi tedavi uygulanmaktadır. Biyopsi örneklerinin formol ya da başka koruyucular içine alınmamasına özen gösterilmesi, işleme almadan önce örneklerin kurummasının önlenmesi için steril serum fizyolojik ya da sıvı besiyerine alınması kültür duyarlılığını artıracak, aynı zamanda tanıya zaman ve ekonomik kayıpları en aza indirecektir.

KAYNAKLAR

1. Aljafari AS, Khalil EA, Elsiddiq KE et al: Diagnosis of tuberculous lymphadenitis by FNAC, microbiological methods and PCR: a comparative study, *Cytopathology* 2004;15(1):44-8.
2. Aksel N, Akgün Tavusbay N, Çakan A, Özsöz A: Lenf bezi tüberkülozlu olgularımız, *Akciğer Arşivi* 2005;1:30-3.
3. Baskota DK, Prasad R, Kumar Sinha B, Amatya RC: Distribution of lymph nodes in the neck in cases of tuberculous cervical lymphadenitis, *Acta Otolaryngol* 2004;124(9):1095-8.
4. Bayazit YA, Bayazit N, Namiduru M: Mycobacterial cervical lymphadenitis, *J Otorinolaryngol Relat Spec* 2004;66(5):275-80.
5. Donald PR, Schaaf HS, Schoeman JF: Tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: the Rich focus revisited, *J Infect* 2005;50(3):193-5.
6. Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT: PCR detection of Mycobacterium tuberculosis, "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*" kitabında s.191-6, American Society for Microbiology, Washington DC (1993).
7. Ergin MA, Kocagöz T, Us D, Günalp A: Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim analizi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması, *Mikrobiyol Bült* 1999;33(4):251-61.
8. Ermiş H, Gökırmak M, Kafkaslı A, Bozdağ Z, Baysal T: Abdominal ve pelvik lenf nodlarında tüberküloz lenadenit, *Solunum* 2005;7(2):80-4.
9. Ilgazlı A, Boyacı H, Basyigit I, Yıldız F: Extrapulmonary tuberculosis: clinical and epidemiologic spectrum of 636 cases, *Arch Med Res* 2004;35(5):435-41.
10. Karagöz T, Şenol T, Bekçi TT: Tüberküloz lenfadenit, *Toraks Derg* 2001;2(1):74-80.
11. Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH: Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories, *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2522-5.
12. Pahwa R, Hedau S, Jain S et al: Assessment of possible tuberculous lymphadenopathy by PCR compared to non-molecular methods, *J Med Microbiol* 2005;54:873-8.
13. Sharma SK, Mohan A: Extrapulmonary tuberculosis, *Indian J Med Res* 2004;120(4):316-53.
14. Siddiqi SH (Becton Dickinson and Company): BACTEC 460 TB System Product and Procedure Manual, Becton Dickinson and Company, Sparks, Md (1995).
15. Şengöz G: Sekseniki tüberküloz menenjitli olgunun değerlendirilmesi, *Tüberküloz Toraks Derg* 2005;53(1):50-5.
16. Tanyel E, Sarıkaya H, Varlık M, Çoban AY, Tülek N: Yaşlı bir hastada ilk bulgusu cilde direne olmuş lenf bezi abseleleri olan miliyer tüberküloz olgusu, *Klimik Derg* 2006;19(1):38-40.
17. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, *J Clin Microbiol* 1993;31(2):171-8.
18. Thompson MM, Underwood MJ, Sayers RD, Dookeran KA, Bell PR: Peripheral tuberculous lymphadenopathy: a review of 67 cases, *Br J Surg* 1992;79(8):763-4.