

شناسایی و مقایسه توالی ژن VP28 ویروس لکه سفید میگو، جدا شده از میگوی وانامی در چابهار (ایران)

فاطمه ناصری^{۱*}، محمدرضا دائمی^۲، محمدحسین سنگتراش^۳، آدم ترکمن زهی^۴

- ۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، اداره دامپزشکی چابهار
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، ایران
- ۳- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، ایران
- ۴- استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: ویروس سندروم لکه سفید (WSSV)، باعث خسارات زیادی در تولید و اقتصاد فرهنگ میگو در سطح جهان است. برای اولین بار بیماری لکه سفید (WSD) در سال ۲۰۰۸ در سیستان و بلوچستان گزارش شده است. ویروس لکه سفید میگو در بین ویروس های آلوده کننده میگو های پنائیده بسیار بیماری زا است.

مواد و روش ها: نمونه های DNA ویروس لکه سفید میگو از میگو های بیمار به دست آمد. از آغازگر اختصاصی PCR برای تکثیر ژن VP28 در WSSV مورد استفاده قرار گرفت. ژن VP28 از DNA جدا شده از WSSV توسط PCR تکثیر شد و محصول PCR تعیین توالی شد.

یافته ها: محصول توالی یابی شده به شماره ثبت (KF723558) در بانک جهانی ژن ثبت شد. توالی نوکلئوتیدی (KF723558) با توالی های ژن VP28 در پایگاه داده NCBI مقایسه شد.

نتیجه گیری: ۳۶٪ توالی هم تراز قابل توجهی با ۹۹٪ شباهت که شامل توالی هایی از کره، ژاپن، ایالات متحده، اندونزی، چین، ویتنام، تایوان، هلند و تایلند نشان داد. با این حال همسانی ۱۰۰٪ در توالی ها مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: ویروس سندروم لکه سفید میگو، واکنش زنجیره ای پلیمرز، میگو، بانک جهانی ژن

مقدمه

ویروس سندرم لکه سفید، یک ویروس میله ای شکل با DNA دو رشته ای و اندازه ذرات ویروس گزارش شده عبارت است از ۲۴۰-۳۸۰ nm طول و ۱۵۹nm - ۷۰ قطر و هسته کپسید مرکزی ۲۰۵-۱۲۰ nm طول و ۱۶۵-۹۵ nm قطر دارد. ویروس با یک غشاء بیرونی از جنس لیپید دو لایه احاطه شده است گاهی اوقات یک دنباله در یک انتهای ویروس وجود دارد (۵،۶). ویروس، میگوهای پنائیده و سایر سخت پوستان را آلوده می

نویسنده مسئول :

اداره دامپزشکی چابهار
ایمیل: Fnaseri55@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۳۱

کند (۱۱). اولین گزارش از بیماری لکه سفید (WSD) در سال ۱۹۹۲ در تایوان در *P. japonicus* بوده است. بیماری به سرعت سایر گونه ها را به ویژه *P. monodon* در بسیاری از بخش های کشورهای آسیایی و آمریکا در سال ۱۹۹۳ درگیر نمود. در ایران بیماری در *P. indicus* در چوئبیده آبادان در سال ۲۰۰۴ مشاهده شد. که در عرض ۳ تا ۱۰ روز، میزان تلفات در استخرها به ۹۰ درصد رسید. در سال ۲۰۰۴ این ویروس صدمه های اقتصادی سنگینی به پرورش میگوی ایران وارد نمود (۱۰). بیماری در سال ۲۰۰۸ برای اولین بار در استخرهای پرورش میگوی گوآتر چابهار مشاهده شد. که باعث خسارت های اقتصادی سنگینی به صنعت پرورش میگو شد. (۱۰). از سال ۲۰۰۸ به بعد میگوی مورد استفاده برای پرورش میگو در چابهار *L. vannamei* بوده

DNA با اتانل رسوب داده شد و خشک گردید. رسوب DNA با ۵۰ میکرو لیتر بافر TE (تریس HCl ۱۰۰ میلی مولار با PH=۸، EDTA ۱۰ میلی مولار با PH=۸) حل شد (۶).

کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به روش طیفسنجی با استفاده از دستگاه بیوفوتومتر اپندورف مشخص شد. حجم واکنش ۵۰ میکرو لیتر و اجزای آن شامل DNA ۲ میکرو لیتر، دو واحد آنزیم Taq پلیمرز، dNTP ۲/۵ میلی مولار ۳ میکرو لیتر، ۱/۵ میکرو لیتر ۵۰ MgCl₂ میلی مولار، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر ۵ پیکومولار، ۵۰ میکرو لیتر بافر ۱۰ x و ۷۵/۳۵ میکرو لیتر آب نوکلئاز فری بود.

VP82-f	agagaattcatggatctttcttcac
VP82-r	acgtcgacttactcggctctcagtc

جدول ۱- توالی آغازگرها (۱۷)

واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر (MWG AG BIOTECH primus96 plus) در ۴۰ سیکل و با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه صورت گرفت. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه نیز انجام شد.

به منظور تأیید تکثیر، الکتروفورز PCR ناحیه مورد نظر طی واکنش های PCR، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. DNA مارکر مورد استفاده ۱۰۰ جفت بازی است.

سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مدل (M02 2661 made in EEC) مورد مشاهده و عکس برداری قرار گرفت. جهت تعیین توالی، مقدار ۳۰ میکرو لیتر از محصولات PCR خالص سازی شد و به همراه ۱۵ میکرو لیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میکرو مولار به منظور تعیین توالی به شرکت سینا کلون ارسال شدند. این نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI ۳۱۳۰ به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی گردیدند.

اطلاعات توالی ژن VP82 ویروس لکه سفید میگو ایزوله چابهار در بانک جهانی ژن ثبت گردید (NCBI, USA). شماره ثبت دریافت شده از بانک جهانی ژن KF723558 است. توالی نوکلئوتیدی

است (۱). سندرم لکه سفید در بسیاری از کشورهای پرورش دهنده میگو در جهان گزارش شده است. از آنجا که WSSV دارای توزیع جغرافیایی و دامنه میزبانی گسترده است، مطالعه های انجام شده در مقایسه مورفولوژی، حدت، ترکیب ژنومی و ترکیب پروتئین در نمونه WSSV های جدا شده توسط محققان مختلف انجام شده است (۳، ۷، ۸، ۹، ۱۵، ۱۶).

بیش از ۴۰ پروتئین WSSV شناخته شده است که در حدود ۳۸ پروتئین ساختمانی در ویرون WSSV قرار گرفته است. از این ها ۲۱ پروتئین در انولوپ، ۱۰ پروتئین در نوکلئوکسپید و ۵ پروتئین در تگومنت قرار دارند (۲).

این پروتئین VP82 توسط جایگاه (ORF421, wsv421) کد می شود و از پروتئین های پوششی اصلی ویروس است که بر طبق مطالعه های صورت گرفته ممکن است نقش مهمی را در مراحل اولیه عفونت در میگو ایفا کند (۱۲، ۱۳).

مطالعه های بیشتر درباره پروتئین VP82 نشان داده است که این پروتئین نقش کلیدی در فرایند عفونت سیستمیک در میگو ایفا می کند (۱۴).

مطالعه حاضر با هدف ردیابی هر گونه تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن VP82 از WSSV جدا شده از میگوهای پرورشی وانامی استخرهای گواتر چابهار و مقایسه آن با توالی های VP82 ثبت شده در بانک جهانی ژن انجام شده است.

مواد و روش ها

میگوی وانامی آلوده به ویروس لکه سفید میگو از مزرعه پرورشی واقع در گواتر چابهار (استان سیستان و بلوچستان) جمع آوری شد و به دو گروه تقسیم شدند.

یک قسمت در الکل اتانل ۷۰٪ قرار داده شد و یک گروه در جوار پودر یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. از این نمونه ها برای استخراج DNA استفاده شد. روش استخراج DNA ویروس، از میگو های آلوده به ویروس به شرح زیر صورت پذیرفت:

پلئوپودها از میگو جدا شد و در NTE بافر به صورت جداگانه هموژن شد. سپس محلول هموژن شده در دور ۳۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. و مایع رویی (۲۰۰ میکرو لیتر) به لوله جدید حاوی ۶۰۰ میکرو لیتر بافر هضم (NaCl ۱۰۰ میلی مولار، تریس HCl ۱۰ میلی مولار با PH=۸، EDTA ۵۰ میلی مولار با PH= ۸، سدیم دود سیل سولفات ۵٪ و پروتئیناز K ۱ mg/ml) اضافه گردید. لوله ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس پروتئین ها چند بار با استفاده از فنل /کلروفرم /ایزوامیل الکل خارج شدند.

کشور	شماره ثبت در بانک ژن	کشور	درصد	کشور	شماره ثبت در بانک ژن	درصد	کشور	شماره ثبت در بانک ژن	درصد
چین	AY249440	۹۹	۱۹	هند	GU734034	۹۹	چین	۱	۹۹
چین	AY249434	۹۹	۲۰	هند	AY422228	۹۹	چین	۲	۹۹
چین	AF332093	۹۹	۲۱	هند	HM484389	۹۹	چین	۳	۹۹
چین	AY682926	۹۹	۲۲	هند	EF661844	۹۹	چین	۴	۹۹
چین	DQ098011	۹۹	۲۳	اندونزی	AY249441	۹۹	چین	۵	۹۹
چین	DQ007315	۹۹	۲۴	ژاپن	AY249443	۹۹	چین	۶	۹۹
چین	AF227911	۹۹	۲۵	کره	AF380842	۹۹	چین	۷	۹۹
چین	AF502435	۹۹	۲۶	کره	AY324881	۹۹	چین	۸	۹۹
چین	DQ979320	۹۹	۲۷	کره	GQ328029	۹۹	چین	۹	۹۹
هند	AY422228	۹۹	۲۸	تایوان	AF272979	۹۹	هند	۱۰	۹۹
هند	EU414753	۹۹	۲۹	تایوان	AF440570	۹۹	هند	۱۱	۹۹
هند	DQ902658	۹۹	۳۰	هلند	AF173993	۹۹	هند	۱۲	۹۹
هند	DQ681069	۹۹	۳۱	هلند	AF369029	۹۹	هند	۱۳	۹۹
هند	DQ013882	۹۹	۳۲	آمریکا	AY249442	۹۹	هند	۱۴	۹۹
هند	DQ013881	۹۹	۳۳	ویتنام	AJ551447	۹۹	هند	۱۵	۹۹
هند	AY873785	۹۹	۳۴	ویتنام	AY168644	۹۹	هند	۱۶	۹۹
هند	EF534254	۹۹	۳۵	ویتنام	JX444993	۹۹	هند	۱۷	۹۹
هند	DQ013883	۹۹	۳۶	تایلند	EF194079	۹۹	هند	۱۸	۹۹

ایزوله ایرانی چابهار، با ۳۶ گونه در بانک اطلاعات ژنی با استفاده از برنامه CLUSTAL W (نرم افزار Mega5) مقایسه گردید. از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی استفاده گردید (۱۲).

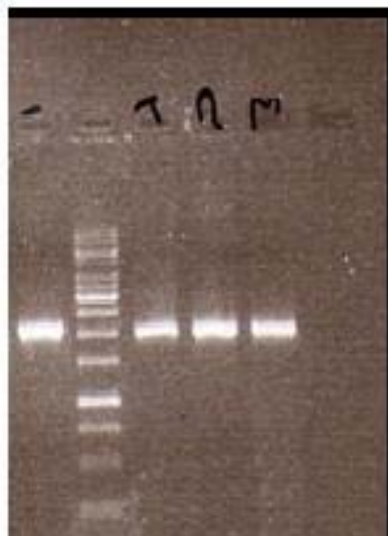
یافته ها:

از تمام نمونه ها با موفقیت استخراج DNA انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن VP82 به طول ۷۰۰ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل شماره ۱). جزئیات توالی های ژن VP82 مورد استفاده برای مقایسه با ایزوله چابهار، شماره ثبت و درصد همولوژی، در جدول ۲ آورده شده است. توالی های ژن VP82 در مقایسه با ایزوله ایرانی تنوع نشان داده است. مقایسه توالی و نتیجه هم ترازی با استفاده از برنامه CLUSTAL W (نرم افزار MEGA5) در شکل ۲ آورده شده است.

جدول ۲- توالی های ژن VP82 مورد استفاده برای مقایسه با ایزوله چابهار، شماره ثبت و درصد همولوژی آن ها با ایزوله چابهار

```
GGATCTTCTTTCACTCTTTCCGGTCGTGCGCCATCCTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTG
TAITTAATTGGATTTTTAGGTATCACAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGA
CAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTCCGCTTCTGTGACTGCTGAGGTGGATC
AGGCTACTTCAAGATGACTGATGTCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAAATCAAGATC
CGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCACTCTCC
GTGGAGGGCCGAGCATCGAAGTACTGTGGGGCAAAATCTCACCTTTGAGGGAACATTC
AAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAG
ATTAACCATCAAAGGCCTTTGCGGTAGCTCCAACACCTCTCTTCAACCCCGTCTCTAT
TGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCAACAAATGAGCT
ACCGCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTCACTACTCTGGCACTGAGACCG
AGTA
```

شکل ۳- توالی نوکلئوتیدی ژن VP82 و ویروس WSSV ایزوله چابهار



شکل ۱- نمونه های RCP شده ژن ۲۸PV و ویروس لکه سفید میگو در محدوده ۷۰۰ جفت باز قرار گرفته اند. مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شده است.

تصویر ژل الکتروفورز شده نمونه های RCP شده با آغازگر های ۲۸PV، آزمایشگاه شبکه دامپزشکی چابهار - تیر ۲۹ جزئیات توالی های ژن ۲۸PV مورد استفاده برای مقایسه با ایزوله چابهار، شماره ثبت و درصد همولوژی، در جدول ۲ آورده شده است. توالی های ژن ۲۸PV در مقایسه با ایزوله ایرانی تنوع نشان داده است. مقایسه توالی و نتیجه هم ترازی با استفاده از برنامه W LATSULC (نرم افزار 5AGEM) در شکل ۲ آورده شده است.

نوکلئوتید شماره ۳۳۹ ایزوله چابهار آدینین است و در تمام توالی های موجود در بانک ژن گوانین بود و هم چنین نوکلئوتید شماره ۵۴۲ ایزوله چابهار گوانین است و در تمام توالی های موجود در بانک ژن سیتوزین بود که نکته قابل توجهی است و به خاطر این دو نوکلئوتید همسانی ۱۰۰ درصد در توالی های مورد مقایسه مشاهده نشد. در شکل شماره ۳ این نوکلئوتید ها مشخص شده اند.

بحث

پنج پروتئین مهم ویروس WSSV گزارش شده است. VP26، VP24 و VP15 در نوکلئوکسپید جای VP19 و VP82 در انولوپ قرار دارند ژن VP82 پروتئین انولوپ را در WSSV کد می کند، نقش کلیدی در عفونت سیستمیک در میگوی مبتلا به WSSV دارد (۱۴). مطالعه ها روی ساختار ژنی WSSV

سپاسگزاری

بدین وسیله از اداره دامپزشکی چابهار که امکان انجام کلیه مراحل آزمایشگاهی را فراهم آورد تقدیر و تشکر به عمل می آید .

و عملکردهایشان به تکمیل تکنیک های تشخیصی نوین و راهکارهای جدید برای کنترل عفونت ویروس کمک می کند.

PCR روش تشخیص مورد قبول در بسیاری از جاها که برای غربال نمودن میگو از نظر ویروس ها به کار می رود. آغازگر های اختصاصی برای تکثیر ژن VP82 از WSSV برای مطالعه اطلاعات توالی نوکلئوتیدی و تنوع آن ها در ژن VP82 ویروس لکه سفید میگو از کشورهای مختلف طراحی شده است. تنوع ژنتیکی در ویروس ها نقش مهمی برای تشخیص و اپیدمیولوژی دارد (۷). جهش در توالی نوکلئوتیدی می تواند از اتصال آغازگرهای PCR برای توالی هدف جلوگیری نماید (۴). که به نتایج PCR منفی کاذب و محصولات PCR غیر اختصاص منجر می شود، و باعث محدود شدن استفاده از کیت های تشخیصی بر پایه PCR برای بعضی استرین های ویروسی می شود. هر چند WSSV انتشار جغرافیایی وسیعی دارد (۷)، تشابه ایزوله های WSSV از نواحی جغرافیایی مختلف با تکثیر قطعات DNA مختلف از ژنوم کامل WSSV با استفاده از سری های آغازگر مختلف برای PCR نشان داده شده است. اگر چه اهمیت ناحیه تکثیر شده مطالعه نشده است، به همین نحو، تکثیر با PCR بخشی از ژن WSSV از چین، ژاپن، اندونزی، تایلند، مالزی و هند ارتباط نزدیکشان را آشکار نموده است (۳).

مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن VP82 از ایزوله چابهار با ایزوله های موجود در بانک ژن اشاره بر این دارد که آن ها از یک جد مشترک منشأ گرفته اند. نتایج این مطالعه که توالی ژن VP82 را از ایزوله چابهار با ۳۶ ایزوله دیگر از نواحی جغرافیایی دیگر مقایسه می کنند تنها نشان داده که تنوع بالایی در بین آن ها وجود ندارد و محدوده همولوژی آن ها ۹۹٪ است.

بر خلاف مطالعه های سابق، مطالعه حاضر توالی نوکلئوتیدی ژن VP82 ایزوله چابهار را با اطلاعات توالی VP82 در دسترس موجود در بانک ژن مقایسه می کند که نقش مهمی در عفونت WSSV ایفا می کند.

در بین توالی های VP82 که تنوع در مقایسه توالی نوکلئوتیدی نشان داده اند ایزوله چابهار در دو نوکلئوتید، نوکلئوتید شماره ۳۳۹ و نوکلئوتید شماره ۵۴۲ با همه توالی های موجود متفاوت بود که در نوکلئوتید شماره ۳۳۹ باز آدنین با باز گوانین در توالی های مورد مقایسه و نوکلئوتید شماره ۵۴۲، باز گوانین که با نوکلئوتید سیتوزین در توالی های مورد مقایسه جایگزین گردیده است که این تفاوت می تواند همولوژی ۹۹٪ را ایجاد نماید و باعث گردد که این توالی با هیچ یک از توالی های موجود همولوژی ۱۰۰٪ را نشان ندهد.

منابع

- 1-Afsharnasab M, Mortezaei R, Yegane V and Kazemi B. Gross sign, histopathology and polymerase chain reaction observations of white spot syndrome virus in shrimp specific pathogen free *Litopenaeus vannamei* in Iran. *Asian Animal and Veterinary Advances*, 2009; 4 (6): 297-305.
- 2-Escobedo-Bonilla C M, Alday-Sanz V, Wille M, Sorgeloos P, Pensaert M and Nauwynck H. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *fish diseases*, 2008; 31 (1): 1-18.
- 3-Kasornchandra J, Boonyaratpalin S and Itami T. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 1998; 164 (1): 243-251.
- 4-Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C and Sninsky J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*, 1990; 18 (4): 999-1005.
- 5-Liu W-J, Chang Y-S, Wang A H-J, Kou G-H and Lo C-F. White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the immediate-early gene iel. *virology*, 2007; 81 (3): 1461-1471.
- 6-Lo C-F, Ho C, Peng S, Chen C H, Hsu H, Chiu Y, Chang C, Liu K, Su M and Wang C. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. 1996.
- 7-Lo C-F, Hsu H-C, Tsai M-F, Ho C-H, Peng S-E, Kou G-H and Lightner D V. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. 1999.
- 8-Nadala Jr E and Loh P C. A comparative study of three different isolates of white spot virus. *Diseases of aquatic organisms*, 1998; 33 (3): 231-234.
- 9-Park J, Lee Y, Lee S and Lee Y. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of aquatic organisms*, 1998; 34 (1): 71-75.
- 10-Pazir M, Afsharnasab M, Jalali Jafari B, Sharifpour I, Motalebi A and Dashtiannasab A. Detection and identification of white spot syndrome virus (wssv) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (ihhnv) of *litopenaeus vannamei* from bushehr and sistan and baloochestan provinces (iran), during 2009-2010. *Iranian Fisheries Sciences*, 2011; 10 (4): 708-726.
- 11-Sánchez-Paz A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary research*, 2010; 41 (6): 43.
- 12-van Hulten M C, Westenberg M, Goodall S D and Vlaskovits J M. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*, 2000; 266 (2): 227-236.
- 13-van Hulten M C, Witteveldt J, Snippe M and Vlaskovits J M. White spot syndrome virus envelope protein VP82 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, 2001; 285 (2): 228-233.
- 14-Wang Q, Nunan L M and Lightner D V. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Dis Aquat Org*, 2000; 43 175-181.
- 15-Wang Q, White B L, Redman R M and Lightner D V. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 1999; 170 (3): 179-194.
- 16-Wongteerasupaya C, Wongwisansri S, Boonsaeng V, Panyim S, Pratanpipat P, Nash G L, Withyachumnarnkul B and Flegel T. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*, 1996; 143 (1): 23-32.
- 17-Zhang X, Huang C, Xu X and Hew C L. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *general virology*, 2002; 83 (5): 1069-1074.