



DENGUE. Diagnóstico por el laboratorio

Marta Cecilia Ospina Ospina
Bacterióloga. Especialista Ciencias Básicas Biomédicas -
Virología
Laboratorio Departamental de Salud Pública
Dirección Seccional de Salud de Antioquia

Resumen

El diagnóstico por laboratorio de la infección por el virus del dengue está basado en pruebas de determinación de anticuerpos y en la detección directa del virus. El diagnóstico serológico se realiza con base en la presencia de anticuerpos IgM o aumento en el título de anticuerpos totales o IgG en sueros tomados en las fases aguda y convalescente de la enfermedad. Los métodos directos comprenden el aislamiento viral, detección del genoma o de los antígenos del virus. Entre los sistemas de aislamiento disponibles están la inoculación de mosquitos y los cultivos en células

El dengue es producido por un virus RNA, que pertenece a la familia *Flaviviridae*, Género *flavivirus*. Se conocen cuatro serotipos: den-1, den-2, den-3 y den-4, antigénicamente relacionados a otros flavivirus y cualquiera de ellos puede producir la enfermedad (1). Después del período de incubación y coincidiendo con la etapa febril, se presenta una fase virémica en la cual el virus circula en sangre periférica durante un promedio de cinco días después del inicio de los síntomas y es eliminado posteriormente mediante la producción de anticuerpos específicos, los cuales pueden neutralizar el virus (2,3). Existen pruebas de laboratorio para detectar la infección, tanto en la fase virémica, como a partir de la producción de anticuerpos.

No existe un tratamiento antiviral específico por lo cual el manejo de la enfermedad es de soporte y seguimiento clínico además, las pruebas

de mamíferos o de insectos. La detección del genoma por RT-PCR permite un diagnóstico específico de serotipo especialmente en la fase temprana de la enfermedad. Las pruebas de inmunohistoquímica permiten detectar el antígeno viral en tejidos y en sangre. La detección del antígeno soluble en el suero parecen tener valor en la predicción del desarrollo de FHD/SCD lo cual le daría a esta prueba una gran utilidad en el pronóstico de la enfermedad. **Palabras clave:** dengue, diagnóstico, laboratorio. ☼

Infectio 2004; 8(3): 225-230

serológicas que son las más utilizadas, sólo establecen un diagnóstico probable y pueden presentar falsos negativos o falsos positivos en sueros de fase aguda; por ésta razón el objetivo de los laboratorios de salud pública es servir como soporte en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad mediante la confirmación de los casos sospechosos y el estudio de brotes o epidemias.

El diagnóstico por laboratorio de la infección por el virus del dengue está basado en pruebas de determinación de anticuerpos o detección directa del virus (4).

1. Determinación de anticuerpos

La respuesta de anticuerpos en la infección aguda por dengue, puede ser: primaria o secundaria. Los flavivirus comparten grupos antigénicos que pueden dar reacción cruzada en

Recibido para evaluación: 15/10/2003 - Aprobado para publicación: 3/08/2004.
Correspondencia: martacospina@yahoo.com

las pruebas serológicas haciendo más difícil el diagnóstico (2). Las personas que nunca han estado infectadas por un flavivirus, o inmunizadas con vacunas para flavivirus (ejm. para el virus de la fiebre amarilla) desarrollan una respuesta primaria, en la cual los anticuerpos son principalmente tipo IgM, mientras que aquellas, que han estado en contacto, o han sufrido previamente una infección por flavivirus, desarrollan una respuesta secundaria con predominio de anticuerpos tipo IgG, aunque los anticuerpos IgM también están presentes (5).

El diagnóstico serológico se realiza con base en la presencia de anticuerpos Ig M o un aumento en el título de anticuerpos Ig G en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad.

Existen diferentes pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos tales como: Inhibición de la hemaglutinación (IH), Test de neutralización (NT), ELISA de captura Ig M (MAC-ELISA) y ELISA Ig G (6).

1.1 Inhibición de la hemaglutinación (IH)

Es la prueba estándar recomendada por la organización mundial de la salud (OMS) para la clasificación de la respuesta serológica en las infecciones por dengue. Se basa en el principio de que el virus dengue, bajo condiciones controladas de pH y Temperatura puede aglutinar glóbulos rojos de ganso, y este efecto puede ser inhibido por anticuerpos específicos contra el virus. Esta prueba se utiliza para cuantificar anticuerpos totales y requiere dos muestras de suero: una en fase aguda y otra en fase convaleciente con intervalo no inferior a siete días (5); el título se expresa como la mayor dilución del suero que produce IH. Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, usualmente aparecen a niveles detectables a partir del día 5 o 6 de la enfermedad en las infecciones primarias, pero se elevan más tempranamente en las infecciones secundarias. Altos niveles IH persisten durante 2-3 meses pero los títulos generalmente empiezan a descender a los 30-40 días y caen por debajo de 1:1280 en la mayoría de los pacientes y permanecen por largos períodos (6).

Esta prueba permite diferenciar infección primaria de infección secundaria de acuerdo con los siguientes criterios (5):

Infección primaria: caso en cuyas muestras de suero, se evidencia un alza cuádruple o mayor, en los títulos de anticuerpos y además, en la muestra convaleciente se encuentran títulos \leq 1:1280.

Infección secundaria: caso en cuyas muestras de suero, se evidencia un alza cuádruple o mayor en los títulos de anticuerpos y en el suero convaleciente se encuentran títulos \geq 1:2560.

Resultado negativo: sin cambio en el título de anticuerpos en ambas muestras y los títulos de anticuerpos, correspondientes al suero de fase convaleciente son \leq 1:1280.

Un título \geq a 1:1,280 en muestra única, es considerado como diagnóstico presuntivo de infección reciente (menos de tres meses), por el virus del dengue (6).

La IH es una prueba confiable que requiere equipo mínimo, sin embargo, es laboriosa, requiere mucho tiempo y su principal desventaja es la reacción cruzada con otros flavivirus, lo que hace difícil la interpretación de los resultados (7).

1.2 Neutralización (NT)

Es el método serológico, más específico y sensible para la detección del virus del dengue (6). Es la única prueba serológica que permite detectar el serotipo infectante. El protocolo más utilizado, es la técnica de neutralización por reducción de placas y debido a su elevada especificidad y a que los anticuerpos neutralizantes persisten por 48 o más años, es muy útil en estudios seroepidemiológicos. Debido al tiempo requerido para su ejecución (al menos una semana) y dificultad técnica, no se utiliza de rutina (6).

Las técnicas descritas hasta ahora (IH y NT) requieren la obtención de muestras pareadas (aguda y convaleciente) son muy laboriosas y demoran el diagnóstico, por lo cual se han venido desarrollado pruebas tipo ELISA, mas simples y rápidas, que permiten discriminar la clase de anticuerpos (IgG o IgM) y clasificar la respuesta serológica con base en la relación IgM/IgG en muestras únicas pero no permiten determinar el serotipo infectante (8).

1.3 ELISA de captura IgM (MAC-ELISA)

Es la prueba más ampliamente utilizada, para el diagnóstico serológico de la infección aguda por el virus del dengue. Se han detectado anticuerpos IgM en el 5º día de inicio de los síntomas, en el 80% de los pacientes (6) y a partir del 6º día en el 90% (2); por lo tanto se recomienda que la muestra sea tomada a partir del día cinco cuando la



probabilidad de encontrar anticuerpos detectables es alta. MAC-ELISA, es un método rápido, sencillo y económico, por lo que se constituye en el sistema de elección para los laboratorios que realizan diagnóstico y vigilancia epidemiológica; esta prueba permite la captura de los anticuerpos IgM, del suero del paciente, utilizando inmunoglobulinas anti-IgM humanas, que están previamente unidas a una fase sólida, disminuyendo así la reacción cruzada causada por anticuerpos extraños y mejorando la especificidad (9). Un resultado positivo en muestra única se considera evidencia presuntiva de infección por el virus del dengue y no significa necesariamente que la infección sea actual, ya que los anticuerpos persisten durante 2-3 meses. Un resultado negativo, no descarta la infección, ya que existe la posibilidad de que el paciente aun no haya desarrollado anticuerpos (6) por lo cual, se recomienda tomar una segunda muestra con intervalo de ocho días.

1.4 ELISA IgG

Los anticuerpos IgG aparecen a partir del 5º día de inicio de síntomas en las infecciones primarias, aumentan gradualmente y permanecen detectables durante muchos años. En infecciones secundarias, los anticuerpos IgG están por lo general presentes en la fase aguda y los títulos aumentan rápidamente en pocos días. (2). Debido a que muchas personas pueden tener anticuerpos IgG de memoria, la presencia IgG en muestra única no tiene utilidad clínica, ya que se requiere obtener sueros pareados para evidenciar el aumento en el título de anticuerpos. Esta prueba al igual que la IH, presenta reacción cruzada con otros flavivirus (2). Se ha encontrado una baja correlación del ELISA IgG con la IH, en sueros pareados correspondientes a pacientes con infecciones primarias (debido a la influencia de los anticuerpos IgM en la IH) y una alta correlación en infecciones secundarias y es posible que en un futuro cuando se tengan mayores estudios, el ELISA IgG pueda reemplazar la IH, debido a que es un método sencillo, fácil de realizar y requiere menor tiempo para su procesamiento (10).

El desarrollo de pruebas rápidas tales como la inmunocromatografía, permite detectar simultáneamente anticuerpos IgM e IgG con resultados en pocos minutos, permitiendo la diferenciación entre infección primaria y secundaria (11). Mediante el uso de ésta prueba, algunos autores han reportado una positividad del 80% en muestras tomadas

cuatro días después del inicio de los síntomas, y superior al 90%, en muestras tomadas en el día 5; sin embargo, también puede presentar reacción cruzada con otros flavivirus (12).

2. Detección directa del virus

El método más específico para confirmar la infección por el virus del dengue es el aislamiento viral pero muchos laboratorios no lo tienen disponible, por razones técnicas y alto costo. La obtención del ácido nucleico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la detección del antígeno viral por inmunohistoquímica, han sido empleadas por laboratorios de cierta complejidad ya que permiten un diagnóstico rápido (4); sin embargo, los laboratorios de virología que realizan diagnóstico de dengue deberían disponer del aislamiento viral para la confirmación de casos, estudios de virología básica y epidemiología molecular entre otros.

El aislamiento viral es un método inequívoco de la presencia del virus. Altos niveles de anticuerpos interfieren con el aislamiento viral por lo tanto, la muestra ideal es el suero tomado en los primeros cinco días a partir del inicio de la fiebre, período que coincide con la fase virémica, en el cual el paciente generalmente no ha formado anticuerpos (3). Entre los sistemas de aislamiento más sensibles están la inoculación intratorácica de mosquitos y la inoculación en células de mamíferos o de insectos.

2.1 Inoculación intratorácica de mosquitos

Es el método más sensible para el aislamiento del virus dengue, por lo cual se recomienda especialmente en los casos de FHD/SCD (6). Los mosquitos más utilizados, son los *Toxorhynchites* ya que no son hematófagos por lo cual pueden manipularse con seguridad, y además, su gran tamaño facilita la inoculación. Como vía de inoculación se utilizan la inyección intratorácica, y debido a que el volumen a inocular es muy pequeño, se requieren de 5-20 mosquitos por muestra. Adultos machos de otras especies tales como *Aedes Aegypti* y *Ae. Albopictus* también pueden ser inoculados con la misma sensibilidad, sin embargo, por ser de menor tamaño la inoculación es más difícil (13,14). Las muestras que se inoculan son suero, plasma, y otros líquidos corporales tales como LCR o líquido pleural.

Después de varios días de incubación, el virus (si está presente), es detectado usualmente por Inmunofluorescencia. La desventaja de este método es que requiere tener un insectario para tener los mosquitos disponibles, requiere mayor tiempo y personal debidamente entrenado.

2.2 Inoculación en células de mamíferos

Se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos entre los que se encuentran líneas celulares como VERO (riñón de mono), BHK21 (riñón de hamster) LLCMK2 (riñón de mono). En general las líneas celulares de mamíferos son menos sensibles que las de mosquitos y requieren muchos pases para observar un efecto citopático (4, 15,16).

2.3 Inoculación en células de mosquito

En los últimos años se han desarrollado una serie de líneas de mosquitos que han resultado ser mucho más sensibles a la infección por el virus del dengue. Las más utilizadas son las células C636 (*Aedes albopictus*), AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*), TRA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*) (15, 16,17). Algunos estudios reportan una menor sensibilidad utilizando las C636 originales, que se cultivan tradicionalmente a 28°C (16); sin embargo, la sublínea C636 HT adaptada a multiplicarse a 34°C, ha mostrado mayor sensibilidad al obtener mayor número de aislamientos. La ventaja de estas líneas celulares es la facilidad de manipulación y rapidez de crecimiento por lo cual se utilizan de rutina para la vigilancia virológica. Una vez inoculada la muestra (idealmente suero), se observan los cultivos por espacio de 10-14 días para la aparición de un efecto citopatógeno caracterizado por formación de sincitios; sin embargo, este efecto es difícil de obtener y puede ser variable (15,16). La detección de la presencia del virus se realiza por inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos policlonales que detectan los cuatro serotipos del virus dengue. Los cultivos positivos son posteriormente analizados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos monoclonales específicos de cada serotipo (18,19).

Las muestras para aislamiento viral deben transportarse al laboratorio, observando estrictamente las normas de bioseguridad; si la muestra se almacena por períodos inferiores a 24 horas, estas deben mantenerse entre 4-8°C. Para almacenamientos más largos, las muestras de

suero y tejido deben guardarse a -70°C (16). El uso de congeladores corrientes (-10 a -20°C) y los ciclos de congelación y descongelación deben evitarse, pues destruyen la infectividad de la muestra.

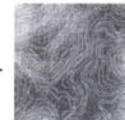
2.4 Detección del ácido nucleico

La prueba de PCR con transcripción reversa (RT-PCR), permite un diagnóstico rápido y específico de serotipo especialmente en la fase temprana de la enfermedad. La prueba utiliza RNA extraído de suero, plasma, o sobrenadante de cultivo (16,20) y permite obtener resultados con una sensibilidad comparable al aislamiento en células C6/36 (2). Varios laboratorios han publicado diferentes protocolos de RT-PCR con combinación de pares de «primers» específicos de los cuatro serotipos, en un solo tubo de reacción, o el uso de un par de primers universal, el cual requiere un paso posterior con primers específicos de serotipo para clasificar las muestras positivas (21,22,23,24).

La prueba de RT-PCR permite detectar el serotipo infectante, pero no debería utilizarse para sustituir el aislamiento viral, ya que la disponibilidad de cepas virales es importante para la caracterización molecular y estudios de patogénesis viral. Además, debido a que esta prueba requiere un buen control de calidad, el laboratorio que la realice, deberá disponer además de pruebas serológicas y métodos de aislamiento viral, que permitan confirmar los resultados o complementar el apoyo diagnóstico y la vigilancia epidemiológica.

2.5 Detección del antígeno viral, por Inmunohistoquímica

Un gran problema para la vigilancia epidemiológica y los laboratorios de virología, es la confirmación de los casos fatales de dengue, ya que la mayoría de los pacientes fallecen al tiempo o poco después de la defervescencia cuando el aislamiento viral es difícil y una prueba única de anticuerpos no establece el diagnóstico (6). Con los nuevos métodos de inmunohistoquímica es posible detectar antígenos en una variedad de tejidos de autopsia (tales como hígado, pulmón, bazo etc.) los cuales deben recolectarse idealmente antes de 24 horas postmortem, para una adecuada tinción del antígeno (5). La prueba puede realizarse de tejido fresco o fijado, proveniente de material de autopsia, de los casos fatales de dengue hemorrágico (6). Esta técnica también es útil para



detectar antígenos de dengue en tejidos incluidos en parafina (25). Algunos autores han encontrado muy buena sensibilidad utilizando esta técnica para la detección de antígeno en células mononucleares de sangre periférica en los tres primeros días de inicio de la fiebre (26).

Toma de muestras en pacientes postmortem

En caso de que el paciente fallezca, se debe notificar al laboratorio la muerte del paciente y obtener una muestra de suero para intentar el aislamiento viral y la serología; además, se deben obtener muestras de tejido por separado, para aislamiento viral e inmunohistoquímica (5). En caso de no ser posible la autopsia, la obtención de un fragmento de hígado por viscerotomía puede ser suficiente. Las muestras de tejido deben remitirse refrigeradas (4°C) y en solución salina isotónica (0.9%), al laboratorio de virología de referencia (27).

Para garantizar una adecuada vigilancia epidemiológica, toda muestra remitida al laboratorio de virología para estudio de dengue, debe acompañarse de la siguiente información:

- Nombre y apellidos del paciente
- Edad y sexo
- Dirección
- Fecha de inicio de síntomas
- Fecha de toma de muestras
- Resumen de los datos clínicos y epidemiológicos del caso
- Impresión diagnóstica
- Nombre del médico tratante

Aunque el laboratorio de virología es una herramienta fundamental para confirmar la infección por dengue, la clasificación clínica de la enfermedad no puede realizarse con base en las pruebas serológicas o virológicas sino de acuerdo a los criterios definidos por la OMS, los cuales requieren un manejo y seguimiento clínico adecuado del paciente. Por lo tanto, el uso del laboratorio debe ser racional, especialmente en situaciones de brotes o epidemias, en los cuales el diagnóstico puede hacerse por asociación epidemiológica con los casos confirmados; de ésta forma se puede dar prioridad a casos individuales o grupos poblacionales, en quienes por razones clínicas o epidemiológicas, la confirmación diagnóstica es necesaria. *

Abstract

Laboratory diagnosis of dengue is based on determination of dengue virus specific antibodies and direct virus detection. Serological diagnosis depends on the presence of Ig M antibodies or a rise in total or IgG antibodies in serums taken in acute and convalescent phases of the illness. Direct methods involve viral isolation, antigens or viral genome detection. Among the available isolation systems are mosquito inoculation and mammals or insect cell cultures. Genome detection by RT-PCR allows a specific diagnosis of serotype especially in the early phase of the illness. Antigen detection in tissues and blood can be made by immunohistochemistry. Detection of the soluble antigen in serum seems to have value in the prediction of the development of FHD/SCD which would give to this test a great utility in the pronostic of the illness. **Key words:** dengue, diagnosis, laboratory.

Referencias

1. **Lindebanch B and Rice Ch.** *Flaviviridae: The viruses and their replication.* En: Fields Virology. 2001. Capítulo 32. 4 Ed. Editors in Chief, D.M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins. Pág. :991-1041.
2. **Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV.** Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1998 Sep 352(9132):971-977.
3. **Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A.** Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bulletin of the World Health Organization.* 1981. 59 (4): 623-630.
4. **Shu PY, Huang JH.** Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic Laboratory immunology.* 2004. 11(4):642-650.
5. **World Health Organization.** Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Laboratory diagnosis. Chapter. 4. Second edition. WHO, Geneva, Switzerland. 1997.
6. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews,* 1998. 11 (3): 480-96.
7. **Clarke DH, Casals J.** Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne-virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1959. 561-573.
8. **Kuno G, Gómez I, Gubler DJ.** An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods.* 1991; 33 (1-2):101-113.
9. **Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig J.** Standardization of

- immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *Journal of clinical microbiology*. 2000. 38 (5): 1823-2639.
10. **Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V.** Evaluation of an Ig G enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol*. 1999; 14 (3): 183-89.
 11. **Sang Ch, Hoon L, Cuzzubbo A, Devine P.** Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of dengue virus infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1998. 5 (3): 407-409.
 12. **Vaughn D.W., Nisalak A, kalayanarooj S, Solomón T, Dung N.M, Cuzzubbo A and Devine PL.** Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol*. 1998; 36 (1): 234-38.
 13. **Rosen L, Gubler D.** The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1974. 23 (6):1153-1160.
 14. **Gubler DJ, Suharyono W, Sumarmo, Wulur H, Jahja E, Saroso S.** Virological surveillance for dengue haemorrhagic fever in Indonesia using the mosquito inoculation technique. *Bulletin of the World Health Organization*. 1979. 57(6): 931-936.
 15. **Manual de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de dengue.** Curso internacional Avances en el conocimiento del dengue y dengue hemorrágico. Instituto Pedro Kourí. La Habana, Cuba. 1997.
 16. **Guzmán MG and Kourí G.** Advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1996; 3 (6): 621-27.
 17. **Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A.** Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull WHO*. 1985; 63(2): 279-286.
 18. **Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE.** Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg*. 1982.31(4): 830-836.
 19. **Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Vélez M, Oliver A.** Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1984. 33 (1): 158-165.
 20. **Martínez Torres E.** Dengue y dengue hemorrágico. Editorial Universidad de Quilmes. 1998 Capítulo 5, p.139-156.
 21. **Lanciotti RS, calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J.Clin Microbiol*. 1992; 30 (3): 545-51.
 22. **Morita K, Tanaka M, Igarashi A.** Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerasa chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991. 29 (10): 2107-2110.
 23. **Henchal EA, Polo SL, Vordam V, Yaemsiri CH, Innis BL, Hoke CH.** Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am J Trop Med Hyg*. 1991. 45 (4):418-428.
 24. **Pereira M.** Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997. 92 (5):595-600
 25. **Sarmiento L, Rodríguez G y Boshell J.** Diagnóstico inmunohistoquímico del dengue en cortes de parafina. *Biomédica*. 1995; 15 (1): 10-15.
 26. **Nisalak A, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Innis B.** Six hour laboratory confirmation of dengue:Antigen detection in peripheral blood mononuclear cells by immunohistochemistry. *Am J Trop Med Hyg*. 1991 (45):173.
 27. **Ministerio de salud, Dirección general de promoción y prevención, Oficina de epidemiología.** El caso de Dengue: Lecciones para fortalecer el proceso global de vigilancia en salud pública en Colombia. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. 1998; 3(4): 50-57.