

An investigation of the prevalence of iceA genotypes in Helicobacter pylori strains isolated from peptic ulcer patients in Sari (2008)

Talebi Bezmin Abadi A(MSc)¹, Mohabati Mobarez A(PhD)^{1*}, Taghvaei T(MD)²

1- Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

2- Department of Internal Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Mazandaran, Iran

Received 17 Jan 2010 Accepted 10 March 2010

Abstract

Background: Helicobacter pylori iceA gene has been reported to be a genetic marker for the development of peptic ulcer in western populations. The aim of this study was to investigate the prevalence of iceA genotypes and their relationship with peptic ulcer in Iran.

Materials and Methods: This observational study was carried out on 75 patients. Biopsy specimens were evaluated for the presence of Helicobacter pylori through rapid urease test. GlmM gene and iceA1 and iceA2 genotypes allelic verification and variation culture were determined via PCR.

Results: In this study, iceA₁ and iceA₂ alleles were identified in peptic ulcer disease (PUD) patients. IceA₁ genotype (64%) was more prevalent than iceA₂ (21.3%). IceA₁ strains were more observable in patients with PUD. No significant relationships were seen between iceA genotypes and the clinical outcomes following infection (p= 0.71).

Conclusion: This study revealed a significant two-tailed correlation between iceA genotypes and PUD occurrence. The results indicate that iceA₁ gene can be used as a reliable marker in predicting the clinical outcomes of Helicobacter pylori infection. Therefore, further in-vitro and in-vivo investigations are needed for reaching general consensus in this regard.

Keywords: Helicobacter pylori, IceA, PCR, Peptic ulcer

*Corresponding author:

Email: mmmobarez@modares.ac.ir

Address: Tarbiat Modares University, Dept of Bacteriology, P.O. Box:14115-111, Tehran, Iran

شیوع ژنوتیپ‌های *iceA* هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده شهرستان ساری در سال 1388

امین طالبی بزمین آبادی¹، دکتر اشرف محبتی مبارز^{2*}، دکتر ترنگ تقوایی³

1- کارشناس ارشد میکروبی شناسی، گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- دانشیار، میکروبی شناسی، گروه باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- استادیار، فوق تخصص گوارش، گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران

تاریخ دریافت 88/10/27، تاریخ پذیرش 88/12/19

چکیده

زمینه و هدف: در جوامع غربی ژن *iceA* هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یک مارکر ژنتیکی مرتبط با زخم معده گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع ژنوتیپ‌های *iceA* هلیکوباکتر پیلوری و ارتباط آن با زخم معده در ایران بوده است.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر با روش مشاهده‌ای بر روی 75 نفر بیمار انجام شده است. نمونه‌های بیوپسی بیماران جهت حضور هلیکو باکتر پیلوری با تست اوره آز، ژن *glmM* و کشت تایید و تغییرات آللیک ژنوتیپ‌های *iceA1* و *iceA2* نیز با PCR تعیین شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه دو آلل *iceA1* و *iceA2* در بیماران مبتلا به زخم معده شناسایی شدند. ژنوتیپ *iceA1* (64 درصد) فراوانی بالاتری نسبت به از ژنوتیپ *iceA2* (21/3 درصد) داشت. سویه‌های *iceA1* بیشتر در بیماران دارای زخم معده مشاهده شدند. در این پژوهش هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های *iceA* با عواقب کلینیکی بعد عفونت مشاهده نشد ($p=0/71$).

نتیجه گیری: این مطالعه ارتباط معنی‌دار دو طرفه‌ای را بین ژنوتیپ‌های *iceA* و وقوع بیماری زخم معده (PUD) را تایید می‌کند. نتایج حاکی از آنست که ژن *iceA1* می‌تواند به عنوان یک مارکر قابل اطمینان در پیش‌گویی عواقب کلینیکی عفونت هلیکوباکتر پیلوری مورد استفاده قرار گیرد. لذا تحقیقات بیشتر *invitro* و *invivo* برای رسیدن به یک توافق عمومی در این مورد ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، *iceA*، PCR، زخم معده

*نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، گروه باکتری شناسی

Email: mmmobarez@modares.ac.ir

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باسیل، اکسیداز، کاتالاز و اوره آز مثبت است که بیش از 50 درصد مردم دنیا به آن آلوده می‌باشند. عفونت هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل اصلی ایجاد زخم معده، دوازدهه و همچنین عامل خطر بالقوه در شروع آدنوکارسینومای معده شناخته شده است. در سال 1994 سازمان بهداشت جهانی (WHO) این باکتری را به عنوان یکی از عوامل تیپ یک کارسینوژن طبقه‌بندی و معرفی کرد (1). در قاره آسیا هلیکوباکتر پیلوری شیوع بسیار بالایی دارد و آدنوکارسینومای معده کشنده‌ترین سرطان در خاور دور محسوب می‌شود (2). طیف وسیعی از عوارض گوارشی متعاقب ابتلای به این باکتری دال بر این حقیقت است که برخی خصوصیت‌های باکتری در کنار عوامل محیطی بر تظاهرات نهایی عفونت ناشی از این باکتری تاثیرگذار است (3-5). علی‌رغم تاثیر ژن‌های متعدد در ویرولانسی باکتری (4-7) مطالعات گسترده هنوز یک ارتباط قطعی بین عواقب کلینیکی عفونت با یک ژن خاص مشخص نکرده است. در هر صورت این باور در بین محققان وجود دارد که سویه‌های ویرولانسی توانایی بیشتری در ایجاد بیماری‌های گوارشی به ویژه زخم معده دارند (8). یکی از این ژن‌های مورد نظر iceA است که به عنوان یکی از کاندیدهای موثر در پاتوژنز هلیکوباکتر پیلوری معرفی شده است (9). عملکرد ژن iceA یا (Induced by contact with epithelium) که معمولاً به دنبال تماس مستقیم سطحی هلیکوباکتر پیلوری با مخاط معده بیان می‌شود تاکنون ناشناخته باقی مانده است (10-14). اولین بار این ژن توسط پیک و همکاران معرفی شد (12). ژن iceA دارای دو آلل به نام‌های iceA₁ و iceA₂ می‌باشد. آلل iceA₁ مولد یک پروتئین مشابه آنزیم اندونوکلاز نایسریا لاکتامیکا می‌باشد در حالی که محصول آلل iceA₂ یک پروتئین با 59 آمینو اسید است؛ این دو محصول هیچ ارتباطی با یکدیگر ندارند. نتایج برخی مطالعات حاکی از ارتباط بین آلل iceA₁ با زخم‌های گوارشی است (15، 16). از این رو پژوهش حاضر نیز با هدف تعیین شیوع ژنوتیپ‌های iceA

هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده شهرستان ساری صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر با روش مشاهده ای بر روی 75 بیمار انجام شده است. ابتدا از 89 بیمار مبتلا به اختلال گوارشی دارای اندیکاسیون اندوسکوپی و بدون سابقه مصرف آنتی بیوتیک نمونه‌گیری به عمل آمده که در نهایت 75 بیمار مبتلا به زخم معده بر اساس یافته‌های بالینی اندوسکوپی شده و برای بررسی وارد مطالعه شدند.

برای کشت و جداسازی باکتری ابتدا نمونه‌های بیوپسی تهیه شده از آنتروم بیماران درون محیط تاپوگلیکولات استریل و فلاسک محتوی یخ قرار داده شد و ظرف 3 ساعت جهت بررسی بیشتر به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه مازندران انتقال یافتند. بیوپسی‌ها بعد از هموژنیزاسیون روی محیط کلمبیا آگار (Merck, Germany) غنی شده با 7 درصد خون دفیبرینه گوسفندی، 7 درصد سرم جنینی گاو، آنتی بیوتیک‌های منتخب (ونکومايسين، تری متوپریم و آمفوتریسین B) (MAST, UK) در شرایط میکروآنروفیل 7 درصد دی اکسید کربن (Binder, USA) رطوبت اشباع و همچنین در دمای 37° C بمدت 6-7 روز انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون بر اساس مورفولوژی کلنی‌ها، تست‌های مثبت اکسیداز، کاتالاز، اوره آز و مشخصات میکروسکوپی مشخص گردید. به دنبال جداسازی اولیه (Primary Isolation)، در کشت‌های ثانویه کشت کلنی‌های تک با هدف جلوگیری از ورود چندین سویه از یک فرد به مطالعه ژنتیکی انجام شد.

استخراج DNA و تکثیر ژن‌های iceA₁ و iceA₂ با روش PCR و استخراج DNA به کمک کیت تجاری شرکت Bioneer از کشور کره جنوبی انجام شد. غلظت DNA استخراج شده در OD 260 بررسی شد. در این مطالعه از ژن glmM برای تایید حضور هلیکوباکتر پیلوری استفاده گردید. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای ذیل (جدول 1) صورت پذیرفت. کلیه پرایمرهای این تحقیق توسط شرکت Bioneer از کشور کره جنوبی سنتز شدند.

جدول 1. پرایمرهای مورد استفاده به همراه سکانس و وزن مولکولی محصول PCR

وزن محصول PCR	سکانس قطعه تکثیر شده	ژن
294bp	F: AAGCTTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT R: AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC	<i>glmM</i>
247bp	F: GTGTTTTTAACCAAAGTATC R: CTATAGCCATTATCTTTGCA	<i>iceA₁</i>
229bp	F: GTTGGGTATATCACAAATTTAT R: TTTCCCTATTTTCTAGTAGGT	<i>iceA₂</i>

فراوانی ژن های *iceA₁* و *iceA₂* در هلیکوباکتر پیلوری های بیماران مبتلا به زخم معده به ترتیب 64 درصد و 21/3 درصد مشاهده گردید. ژنوتیپ *iceA₁* (64 درصد) دارای فراوانی بالاتری نسبت به ژنوتیپ *iceA₂* (21/3 درصد) بوده است (جدول 2). در این پژوهش 2 سویه (2/6 درصد) دارای هر دو آلل بودند و 7 سویه (9 درصد) نیز دارای هیچ یک از آلل ها نبودند. هیچ گونه ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های *iceA* با عواقب کلینیکی بعد از عفونت مشاهده نشد ($p=0/71$). فراوانی ژنوتیپ های مختلف در جمعیت مورد مطالعه به طور خلاصه در جدول 2 آمده است.

جدول 2. فراوانی ژنوتیپ های مختلف در جمعیت مورد مطالعه

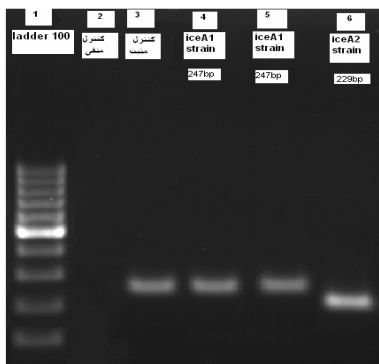
ترکیب ژنوتیپ ها	<i>iceA₁(+)</i>	<i>iceA₁(-)</i>	<i>iceA₂(+)</i>	<i>iceA₂(-)</i>
فراوانی ژنوتیپ در بیماران	2/6%	21/3%	64%	9%

حجم کلی واکنش PCR 20 میکرولیتر بود که شامل 18 میکرولیتر مخلوط مستر، 1 میکرولیتر DNA و 0/5 میکرولیتر از هر کدام پرایمرها را شامل می شود. برنامه PCR ژن های *iceA₁* و *iceA₂* شامل 4 دقیقه در 90 درجه جهت باز شدن DNA و سپس 1 دقیقه در 57 درجه جهت اتصال پرایمرهای مربوطه، و در نهایت 2 دقیقه جهت طویل سازی رشته محصول در دمای 72 درجه در 32 سیکل انجام پذیرفت. همچنین برنامه PCR ژن *glmM* شامل 1 دقیقه در 90 درجه جهت باز شدن DNA و سپس 45 ثانیه در 56 درجه جهت اتصال پرایمرهای مربوطه و در پایان هم 45 ثانیه جهت طویل سازی رشته محصول در دمای 72 درجه در 31 سیکل مورد استفاده قرار گرفت. واکنش های PCR برای ژن های نامبرده شده به صورت جداگانه انجام و محصولات PCR بر روی ژل آگاروز 2 درصد با ولتاژ 80 به مدت 45 دقیقه الکتروفورز شدند. از ژل مزبور تحت نور UV عکس گرفته و باندهای مربوطه مورد بررسی قرار گرفتند لازم به ذکر است که کلیه نمونه ها موافقت خود را با شرکت در این مطالعه اعلام داشته و از تمام آنها رضایت نامه کتبی اخذ گردیده است.

داده های این مطالعه از طریق از نرم افزار SPSS نسخه 15 و با استفاده از آزمون کای اسکویئر مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها

در پژوهش حاضر از 89 بیمار مبتلا به زخم معده 84/5 درصد آنها برای هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند که این ایزوله ها بعد از کشت با اوره آز، کاتالاز، اکسیداز و حضور ژن *glmM* تایید شدند. حضور ژن *iceA* و آلل های آن به ترتیب برای *iceA₁* و *iceA₂* در PCR با محصول سایز 247bp و 229bp مورد مطالعه قرار گرفت (شکل 1).



شکل 1. الکتروفورز محصولات PCR، از چپ به راست؛ چاهک 1 شامل مارکر 100 جفت بازی، چاهک 2 شامل کنترل منفی، چاهک 3 شامل کنترل مثبت، چاهکهای 4، 5 شامل ایزوله های کلینیکی *iceA₁* مثبت (247bp) و چاهک 6 (ایزوله *iceA₂* مثبت (229 bp)

در مطالعه حاضر هیچگونه ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ iceA₁ و iceA₂ و جنسیت جمعیت مشاهده نشد (p=0/71). همچنین در این مطالعه یک ارتباط معنی دار مشخص بین ژنوتیپ های iceA₁ و iceA₂ با بروز زخم های گوارشی مشاهده شد (p=0/03).

بحث

هلیکوباکتر پیلوری از عوامل مهم اتیولوژیک زخم های گوارشی شناخته شده است. هرچند افراد زیادی به این ارگانسیم پیچیده آلوده می شوند اما تنها 15 درصد آنها به انواع بیماری های گوارشی مبتلا می شوند (17). عوامل ویروالانس متعددی در هلیکوباکتر پیلوری معرفی شده اند (7-5). اما ادهسین های این باکتری نظیر alpA, SabA, SabB, BabA, و iceA همواره مورد توجه و مطالعه بوده اند (18). ژن iceA یک فاکتور ویروالانس و ادهسینی مهم در این باکتری است که دارای دو آلل iceA₁ و iceA₂ است، که فعالیت اصلی این ژن تاکنون شناخته نشده اما گزارش شده که در تماس باکتری با سلول های اپی تلیال معده این ژن بیان می شود (10-14). از طرفی مطالعات اپیدمیولوژی مختلف نیز ارتباط این ژن و الل های مختلف آن را با زخم معده، زخم دئودنال و سرطان معده در نواحی جغرافیایی مختلف به اثبات رسانیده است (15، 16). اخیراً گزارش شده که iceA₁ در تماس با اپیتلیوم معده تحریک و غلظت IL8 نیز افزایش می یابد (12). نتایج این مطالعه حاکی از حضور درصد بالای آلل iceA₁ در بیماران مبتلا به زخم معده بوده؛ در حالی که میزان iceA₂ درصد کمی مشاهده شد. درباره ارتباط بین حضور این ژن و زخم معده، زخم دئودنال و سرطان معده در دنیا گزارشات ضد و نقیضی وجود دارد. یاماکا و همکاران در ژاپن (19) هرگونه ارتباط بین آلل های iceA₂ و iceA₁ با بروز اختلال های گوارشی را رد کرده اند؛ در حالی که در هلند (16) و امریکا (20) این ارتباط تایید شده است. البته در بعضی از گزارشات فراوانی ژنوتیپ iceA₂ در بیماران مبتلا به زخم معده گزارش شده است (21). در ایران، در شهرستان بابل و نیز در بین 20 بیمار، میزان شیوع ژنوتیپ

iceA₁ در حدود 66/7 درصد، و میزان ژنوتیپ iceA₂ نیز حدود 23/8 درصد گزارش شده است (22). در ترکیه نیز iceA₁ در 32/2 درصد سویه ها و iceA₂ نیز در 13/8 درصد سویه های هلیکوباکتر پیلوری گزارش شده است (23). نتیجه این تحقیقات نشان می دهد که ژن iceA همچنان می تواند به عنوان یک مارکر مناسب در تشخیص و تمیز برخی سویه های ویروالانس در ایجاد زخم معده مورد مطالعه قرار گیرد و همچنین اختلافات مشاهده شده در این تحقیقات می تواند بخوبی مبین تنوع ژنتیکی اقلیم های گوناگون و سطوح مختلف اقتصادی اجتماعی زندگی در نواحی مختلف دنیا باشد. با توجه به اهمیت این ژن، مطالعات invitro و in vivo روی عملکرد ژن iceA به منظور کشف ارتباطات دقیق آن با سایر جنبه های ارتباط میکروبی و میزبان ضروری است. از طرفی لازم است، ارتباط قطعی همزمانی بروز هر یک از آلل های ژن iceA با اختلالات گوارشی در مطالعه ای با حجم نمونه بالا به همراه سایر مطالعات ژنتیک مولکولی انجام پذیرد.

نتیجه گیری

ژن iceA₁ می تواند مارکر مناسبی در پیش گویی عواقب کلینیکی عفونت هلیکوباکتر پیلوری مورد استفاده قرار بگیرد. لذا تحقیقات بیشتر invitro و in vivo برای رسیدن به یک توافق عمومی در این مورد ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت مالی طرح و همچنین خانم عبدولی که در تایپ و ویراستاری همکاری نموده اند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Infection with Helicobacter pylori. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994; 61: 177-240.
2. Nguyen L, Uchida T, Murakami K, Fujioka T, Moriyama M. Helicobacter pylori virulence

- and the diversity of gastric cancer in Asia. *J Med Microbiol.* 2008 Dec;57(Pt 12):1445-53.
3. Nguyen T, Barkun A, Fallone C. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter.* 1999 Sep; 4(3): 185-97.
 4. De Luca A, Iaquinto G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Lett.* 2004 Sep;213(1):1-10.
 5. Salehi Z, Jelodar M, Rassa M, Ahaki M, Mollasalehi H, Mashayekhi F. *Helicobacter pylori* cagA status and peptic ulcer disease in Iran. *Dig Dis Sci.* 2009 Mar;54(3):608-13.
 6. Oliveira M, Costa A, Costa A, Henriques L, Suriano G, Atherton J, et al. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry.* 2006; 281(46): 34888.
 7. Nguyen L, Uchida T, Tsukamoto Y, Kuroda A, Okimoto T, Kodama M, et al. *Helicobacter pylori* dupA gene is not associated with clinical outcomes in the Japanese population. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Aug;16(8):1264-9.
 8. Boyanova L, Markovska R, Yordanov D, Marina M, Ivanova K, Panayotov S, et al. High prevalence of virulent *Helicobacter pylori* strains in symptomatic Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Aug; 64(4): 374-80.
 9. Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis.* 2008 Jan; 12(1): 30-6.
 10. Jiang X, Doyle M. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 2000 May; 38(5): 1984-7.
 11. Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, et al. Sequence analysis and clinical significance of the iceA gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb; 38(2): 483-8.
 12. Peek RJ, van Doorn L, Donahue J, Tham K, Figueiredo C, Blaser M, et al. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression in vivo and relationship to gastric pathology. *Infect Immun.* 2000 Oct; 68(10): 5488-95.
 13. Ashour A, Collares G, Mendes E, de Gusmão V, Queiroz D, Magalhães P, et al. iceA genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol.* 2001 May;39(5):1746-50.
 14. McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl K, Price A, et al. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Apr;49(4):601-9.
 15. Lu J, Perng C, Shyu R, Chen C, Lou Q, Chong S, et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol.* 1999 Mar;37(3):772-4.
 16. van Doorn L, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1998 Jul; 115(1):58-66.
 17. Makola D, Peura D, Crowe S. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol.* 2007 Jul; 41(6): 548-58.
 18. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006 Dec;11(6):574-80.
 19. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim J, Kashima K, Graham D. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol.* 1999 Jul; 37(7): 2274-9.
 20. Miehle S, Yu J, Schuppler M, Frings C, Kirsch C, Negraszus N, et al. *Helicobacter pylori* vacA, iceA, and cagA status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *Am J Gastroenterol.* 2001 Apr;96(4):1008-13.
 21. Xu Q, Blaser M. Promoters of the CATG-specific methyltransferase gene hpyIM differ between iceA1 and iceA2 *Helicobacter pylori* strains. *J Bacteriol.* 2001 Jul;183(13):3875-84.
 22. Shokri Shirvani J, Rajabnia R, Tohidi F, Asmar M, Taheri H. Outbreak of caga and icea in h. pylori strains isolated from patients with gastro duodenal diseases in babol city. *Journal Of Babol University Of Medical Sciences*

(JBUMS). 2008 APRIL-MAY; 10(1 (42)):46-53.

23. Baglan P, Bozdayi G, Ozkan M, Ahmed K, Bozdayi A, Ozden A. Clarithromycin resistance

prevalence and Icea gene status in Helicobacter Pylori clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. Journal of microbiology. 2006;44(4):409-16.