



Utilidad del mielocultivo para el diagnóstico etiológico de infecciones bacterianas

Oliver Solimano Ana Carolina,* Bove Britos Virginia,* Bradvica Vera Virginia,* Batista Umpierrez Noelia,† Palacio Patiño Rosario,† Guillermo Esposito Cecilia,* Díaz Filgueira Lilián,* Seija Scaroni Verónica†

Palabras clave:

Mielocultivo,
fiebre de origen
desconocido,
citopenias.

Key words:

*Bone marrow culture,
fever of unknown
origin, cytopenias.*

RESUMEN

Introducción: En nuestro país, el uso de mielocultivo forma parte del algoritmo para el diagnóstico de procesos infecciosos en pacientes con fiebre de origen desconocido (FOD). Sin embargo, a nivel internacional hay controversias con respecto a su utilidad. El objetivo fue evaluar la capacidad del mielocultivo para recuperar agentes bacterianos específicos e inespecíficos en pacientes o asistidos en el Hospital de Clínicas con FOD y/o citopenias en quienes se solicitó este estudio. **Material y métodos:** Estudio retrospectivo que incluyó pacientes a quienes se les realizó mielocultivo en el Hospital de Clínicas entre marzo de 2007 y diciembre de 2013. **Resultados:** Se incluyeron 69 pacientes. En 44 se realizó el mielocultivo por citopenias y en 25 por FOD. VIH positivos eran 58. De los mieloculturivos realizados para gérmenes inespecíficos, tres de 69 fueron positivos; en un caso se aisló *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente y en dos *Staphylococcus epidermidis*. Se realizó mielocultivo para gérmenes específicos a 59 pacientes; tres fueron positivos, todos ellos en pacientes VIH positivos; dos para *Mycobacterium avium complex* (MAC), ambos estudiados por citopenias, y uno para *Mycobacterium tuberculosis* (MT), solicitado por FOD. Uno de los 69 mieloculturivos llevados a cabo determinó cambios en la terapéutica. **Conclusiones:** La tasa de recuperación de un agente infeccioso por parte del mielocultivo fue baja con respecto al total realizado. Al tratarse de un estudio invasivo y con obtención lenta de resultados, a la luz de estudios con mayor potencial, planteamos su baja utilidad actual en nuestra población.

ABSTRACT

Introduction: Bone marrow culture is part of the diagnostic algorithm of infectious processes in patients with fever of unknown origin (FUO) in our country. However, there are controversies regarding its usefulness on an international level. The primary objective of the study was to evaluate the ability of bone marrow cultures to recover specific and non-specific bacterial agents in patients with FUO and/or cytopenias assisted in the Hospital de Clínicas. **Material and methods:** A retrospective study that included patients who underwent marrow culture at the Hospital de Clínicas between March 2007 and December 2013. **Results:** 69 patients were included: 44 because of cytopenia and 25 because of FUO. 58 were HIV positive. Three of the 69 marrow cultures were positive for non-specific bacteria; in one case, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was isolated, and in two, *Staphylococcus epidermidis*. Marrow culture was performed for specific germs in 59 patients; three were positive, all of them in HIV positive patients; two for *Mycobacterium avium complex* (MAC), both studied due to cytopenias, and one for *Mycobacterium tuberculosis* (MT), requested for FUO. One of the 69 marrow cultures performed determined changes in therapeutics. **Conclusions:** Bone marrow culture had a low rate of recovery of an infectious agent with respect to the total of studies performed. Being an invasive study with slow results, in the light of studies with greater potential, we propose its current low usefulness in our population.

* Cátedra de Hematología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina.

† Departamento de Laboratorio de Patología Clínica, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina.

Montevideo, Uruguay.

Correspondencia:
Ana Carolina Oliver Solimano
Av. Italia s/n.
Tel: 24875842
E-mail:
carolinaoliver80@gmail.com

Recibido:
07/12/2017
Aceptado:
05/04/2018

INTRODUCCIÓN

El estudio de médula ósea (MO) puede realizarse a través de mielograma, mielocultivo y/o biopsia de médula ósea (BMO). Este estudio es una herramienta fundamental en la valoración de enfermedades hematológicas.¹ Además, los estudios de MO se han extendido al estudio de otras condiciones no hematológicas, como la investigación de la

fiebre de origen desconocido (FOD). La FOD es una entidad de baja prevalencia, pero sigue siendo un reto para la medicina. Las infecciones corresponden a un tercio de las causas de FOD; las infecciones bacterianas son 20% del total, aproximada.

En este sentido, es conocida su utilización en la valoración de pacientes portadores de virus de inmunodeficiencia humana (VIH).² Sin embargo, se discute su rol debido a la creciente

disponibilidad de métodos diagnósticos más sensibles para la detección bacteriana.

Un aspecto controversial es si el aislamiento microbiológico en MO proporciona información diagnóstica adicional con respecto a otras formas de relevo microbiológico. Algunos trabajos plantean que el aislamiento en hemocultivos concomitantes es igual o superior al estudio de MO.³ Se han reportado resultados variables, encontrándose que entre 75 y 100% de los pacientes con mielocultivos positivos presentan hemocultivos positivos para el mismo germen.⁴⁻⁶

Basándonos en estos antecedentes, llevamos a cabo un estudio que tuvo como objetivo evaluar la utilidad del mielocultivo para el diagnóstico etiológico de infecciones bacterianas tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población: Se llevó adelante un estudio descriptivo, observacional y retrospectivo. Se incluyeron todos los pacientes a quienes se les realizó mielocultivo para investigación de bacterias inespecíficas y/o *Mycobacterium* sp. en el periodo comprendido entre marzo de 2007 y diciembre de 2013 en el Hospital de Clínicas. Se incluyeron sólo pacientes en quienes se pudieron obtener datos clínicos completos y fueron excluidos aquellos en los que se realizó mielocultivo por alguna causa diferente a citopenia o FOD.

Definiciones:

Citopenia: para la serie roja, se definió como concentración de Hb < 12 g/dL en la mujer y < 13 g/dL en el hombre; para la serie plaquetaria, recuento de plaquetas < 100,000/mm³, y para la serie blanca, recuento de neutrófilos < 1,500/mm³; valores obtenidos en el hemograma realizado dentro de las 24 horas previas a la realización del mielograma.

FOD clásica: temperatura > 38.3 °C de duración > tres semanas sin diagnóstico tras tres días de ingreso hospitalario o tres visitas ambulatorias.

Los hemocultivos considerados en el análisis fueron los realizados dentro de los siete días previos a la recolección de la muestra de médula ósea.

Basamos la definición de portador de VIH y estadio sida en la clasificación de la CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), que incluye categorías clínicas y recuentos de linfocitos CD4+.⁷

Portador de VIH: infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 o 2, que se caracteriza por presentar un deterioro progresivo del sistema inmune y clínica es asintomática o sin enfermedades marcadoras

de estadio sida, y con un conteo de linfocitos mayor a 200/mm³.

Definición de etapa sida: paciente asintomático o con enfermedades marcadoras o no de estadio sida y conteo de linfocitos CD4+ menor o igual a 200/mm³, así como aquellos con enfermedades marcadoras de sida, con independencia del recuento de linfocitos CD4+.

Se consideraron enfermedades marcadoras de estadio sida: neumocistosis; toxoplasmosis encefálica; histoplasmosis diseminada o extrapulmonar; tuberculosis; micobacteriosis atípica diseminada o extrapulmonar; criptococosis extrapulmonar; diarrea de más de un mes de duración por *Cryptosporidium* o *Isospora belli*; candidiasis (esófago, tráquea, bronquios o pulmón); citomegalovirus fuera de ganglio, bazo o hígado; herpes simple de más de un mes o visceral; leucoencefalopatía multifocal progresiva; más de dos neumonías inespecíficas en un año; coccidioidomicosis diseminada o extrapulmonar; salmonelosis sistémica no tifoídica; sarcoma de Kaposi, linfoma cerebral primario, linfoma no Hodgkin; carcinoma extenso del cuello uterino; síndrome de desgaste y encefalopatía por VIH.

Cultivos: La muestra se recolectó por la técnica habitual de realización de mielogramas, efectuando asepsia previa de la piel con dos antisépticos.

Un volumen de aproximadamente 1.5 cm³ se inoculó en una botella de hemocultivo FAN aerobio BacTalert. Dicha muestra se colocó en el sistema de detección continua de crecimiento BacTalert 3D durante 14 días. Cuando el sistema detectó una muestra positiva, se procedió a extraer una muestra de la botella correspondiente para realizar examen directo con tinción de Gram y reaislamiento en agar sangre y agar chocolate. Estos medios se incubaron en atmósfera enriquecida con CO₂. Los aislamientos obtenidos se identificaron con técnicas estándar.

Investigación de micobacterias: Las muestras de MO fueron remitidas al Departamento de Laboratorio de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes CHLA-EP, donde se realizaron los cultivos para micobacterias utilizando los sistemas rápidos automatizados MB-BacT® (BioMerieux) y BD BACTEC MGIT® (Becton Dickinson). Las micobacterias aisladas fueron identificadas en todos los casos realizando estudios fenotípicos y genotipificación utilizando el sistema de amplificación-hibridación GenoType Mycobacterium CM/AS® (Hain Lifescience).

Metodología y análisis: La recolección de datos se realizó a través de un formulario donde se colectaron los datos de interés a través de la revisión de historias clínicas y bases de datos del Departamento de Laboratorio de Patología Clínica – Repartición Microbiología y del

Departamento de Laboratorio de la Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa (CHLA). La captación de pacientes se llevó a cabo solicitando al laboratorio los registros de las muestras de mielocultivo hechas en el periodo del estudio.

Métodos estadísticos: Los datos se volcaron a una planilla Excel y, para caracterizar a la población, se usaron medidas descriptivas de tendencia central y dispersión como media, mediana, rango y desvío estándar.

Ética: Los datos fueron manejados en forma anónima siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki.

RESULTADOS

En el periodo de marzo de 2007 a diciembre de 2013 se realizaron mielocultivos a 85 pacientes: 34 (40%) de sexo femenino y 51 (60%) de sexo masculino. La media-

na de edad fue 40 años (rango 18-72 años). Del total de mielocultivos llevados a cabo, se obtuvieron datos de 69 pacientes, por lo que ésta fue nuestra población analizada.

En cuanto a la indicación del estudio, en 44 (63.8%) pacientes fue por citopenias y en 25 (36.2%) por FOD. Del total, 58 (84.1%) eran VIH positivos, y de estos, 56 se encontraban en etapa SIDA. Se obtuvo el valor de CD4 de 51 pacientes VIH positivos, 49 (96%) tenían un valor menor a 200/mm³. En pacientes VIH positivos (n = 58), la indicación del estudio fue en 42 (72.4%) por citopenias y en 16 (27.6%) por FOD. En los VIH negativos (n = 11), dos fueron por citopenias y nueve por FOD. En los pacientes con citopenia, la media de Hb fue de 8.6 ± 1.5 g/dL (DE), la mediana de neutrófilos fue 1,590/mm³ (rango: 220-49,330) y la mediana de plaquetas fue de 67,000/mm³ (rango: 5,000-476,000). De los 69 pacientes, 14 tenían pancitopenia, 53 bicitopenia y dos hemograma normal. Las características clínicas de los pacientes se pueden ver en el cuadro I.

Se realizó estudio citológico de médula ósea a 59 pacientes y en ningún caso hubo hallazgos diagnósticos específicos. A 10 se les hizo BMO; de ellos, ocho no mostraron alteraciones, en uno se observó fibrosis y en uno dishemopoiesis.

De los mielocultivos efectuados para gérmenes inespecíficos, tres de 69 fueron positivos; en un caso se aisló *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente (SAMR) y en dos *Staphylococcus epidermidis*. El primer caso correspondió a una paciente VIH (-) y el resultado determinó cambios en el tratamiento antibiótico. En los otros dos casos, se interpretó que el aislamiento correspondía a contaminación, dado el cuadro clínico y hemocultivos negativos.

Se realizó mielocultivo para gérmenes específicos en 59 (85.5%) pacientes; tres (4.3%) fueron positivos, todos ellos en pacientes VIH (+); dos para *Mycobacterium avium complex* (MAC), ambos estudiados por citopenias, y uno para *Mycobacterium tuberculosis* (MT), solicitado por FOD. En este último caso, en el hemocultivo se aisló el mismo germe, mientras en los dos restantes, en uno no se hizo hemocultivo y en el otro no se aisló germe. El caso con mielocultivo y HC positivo a MT recibió tratamiento; en cambio, los casos donde se aislaron MAC no recibieron tratamiento específico debido a que fallecieron por complicaciones antes de obtener este resultado.

En 44 pacientes se llevaron a cabo hemocultivos concomitantemente; cinco fueron positivos. Los aislamientos fueron: en VIH (+), dos MAC, un MT, un *Escherichia coli*, y en VIH (-), un SAMR. De estos, el mielocultivo fue negativo en cuatro casos. En el cuadro II se pueden ver los aislamientos microbiológicos.

Cuadro I. Características de la población.

	Valor (n = 69)	Porcentaje
Sexo N		
Hombre	41	60
Mujer	28	40
Raza N (%)		
Blanca	69	100
Negra	0	0
Edad	40 (18-72)	
Indicación del estudio		
Citopenia	44	63.8
FOD	25	36.2
VIH		
Positivo	58	84.1
Negativo	11	15.9
Estadio SIDA	56	96.5
Población CD4		
< 50	25	43.1
50-100	16	27.5
101-200	8	13.8
> 200	2	3.5
Sin dato	7	12.1
Citopenia N (%)	65	94.2
Media de hemoglobina	8.6 g/dL	
Media de plaquetas	67,000	
Media de neutrófilos	1,590	

FOD = fiebre de origen desconocido; VIH = virus de inmunodeficiencia humana; SIDA = síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Cuadro II. Aislamientos microbiológicos según tipo de muestra.					
Microorganismos aislados	Aislamiento exclusivo en MC	Aislamiento exclusivo en HC	Aislamiento en HC y MC	Aislado en portador de VIH	Aislado en VIH negativo
SAMAR	1	1	0	0	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	2	0
MAC	2	2	0	4	0
MT	0	0	1	1	0
<i>Escherichia coli</i>	0	1	0	1	0
Total	5	4	1	8	2

SAMAR = *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente; MAC = *Mycobacterium avium complex*; MT = *Mycobacterium tuberculosis*.

DISCUSIÓN

El uso de mielocultivo como herramienta para la detección de microorganismos causantes de infección está siendo sustituido por métodos más simples y sensibles como los hemocultivos. Los casos donde está demostrada con claridad la superioridad del mielocultivo sobre los hemocultivos es en la detección de *Salmonella typhi* y *Brucella* sp.⁸⁻¹¹

En nuestra serie, la utilidad del mielocultivo para el diagnóstico de gérmenes inespecíficos fue baja, ya que sólo en un caso esta muestra fue positiva, aislándose SAMR, y este germen no fue aislado de muestras de hemocultivo. Esta situación es similar a la reportada por Duong y sus colaboradores. En su estudio realizaron 367 mielocultivos para gérmenes inespecíficos y sólo obtuvieron un cultivo positivo a *Enterococcus faecium*, el cual también fue aislado en un hemocultivo concomitantemente.³

En nuestro estudio llevamos a cabo 59 mielocultivos para gérmenes específicos y detectamos dos MAC y un MT, o sea, 5% de positividad. En el trabajo de Duong y su grupo se hicieron 432 mielocultivos para gérmenes específicos, donde se encontró que 3% eran positivos para MAC, pero a su vez estos fueron detectados mediante un método menos invasivo, como el cultivo en sangre. En nuestro caso, el aislamiento de MT también se realizó en hemocultivos. Una situación similar se reportó en el trabajo de Volk y sus colegas, donde en 215 mielocultivos efectuados, sólo un caso fue positivo con MAC, que también se aisló de un hemocultivo.¹²

En la bibliografía también existen reportes que marcan un beneficio en la realización de mielocultivo en los pacientes portadores de VIH. En ese sentido, en el estudio de Talbot y su equipo se comparó la eficacia del

mielocultivo con respecto a cultivo de otros sitios.⁴ De 1,225 mielocultivos llevados a cabo para micobacterias y hongos, 24 pacientes obtuvieron resultado positivo en MO y 18 de ellos un cultivo positivo al mismo germe en sangre u otro sitio; estos cultivos se hicieron con una diferencia de ± 4 semanas entre la obtención de las muestras. Seis pacientes tuvieron resultados positivos solamente en médula: cuatro para MAC, uno para *Mycobacterium chelonae* y uno para *Histoplasma capsulatum*. Concluyeron que el mielocultivo es una herramienta útil asociada a otros cultivos en pacientes portadores de VIH. En nuestra serie no se realizó la búsqueda sistemática de *H. capsulatum*, para la cual se requiere enviar una muestra de MO con anticoagulante al Laboratorio de Micología, ya que este agente no crece en botellas de hemocultivos y se requiere hacer examen directo y cultivo en medios específicos para su recuperación.

En el artículo de Riley y sus colaboradores se propone la utilidad del estudio de MO (mielocultivo o BMO) en los pacientes severamente inmunocomprometidos, y no así en inmunocompetentes.¹³ De cinco pacientes con MT (tres VIH y dos no VIH), ninguno fue detectado sólo por mielocultivo; en cambio, de 36 pacientes con MAC y VIH positivos, 12 fueron aislados sólo en estudios de MO, y de estos, ningún aislamiento se dio en inmunocompetentes.

En relación con el impacto de los resultados positivos de los mielocultivos ($n = 4$), en dos casos (MAC) el diagnóstico no llegó a tiempo para poder instaurar medidas terapéuticas; en el caso de MT, se pudo realizar un tratamiento específico, pero el aislamiento coincidió con HC positivos, y en el caso donde se aisló SAMR, se pudo realizar tratamiento dirigido.

Este estudio tiene sesgos y limitaciones, como ser retrospectivo y en una pequeña población de un único centro. Además, si bien en Uruguay no son frecuentes las infecciones por *Leishmania* spp., no se realizó búsqueda diagnóstica para leishmaniasis ni micosis profundas en la población estudiada. Si bien la mayoría de la población era VIH positiva, también se realizó mielocultivo en ciertos casos de pacientes VIH negativos. Diferentes estudios mostraron un mejor desempeño del mielocultivo en pacientes VIH con fiebre de origen desconocido.

Se realizaron 69 de MO y sólo en un paciente el estudio tuvo un cambio terapéutico; planteamos que fue necesario realizar 69 cultivos de MO para obtener un resultado que cambió la terapéutica. Teniendo en cuenta que es un estudio invasivo, que la demora en obtener sus resultados en general no permite el inicio de un tratamiento específico precoz, que infrecuentemente permite un cambio en la terapéutica, asociado a las mejoras en los últimos años en los aislamientos microbiológicos a nivel de hemocultivos y otros líquidos, se plantea que el mielocultivo tiene baja rentabilidad para la detección de bacterias.

A nivel internacional, existe consenso en incluir el mielocultivo en pacientes portadores de VIH en estudio por citopenias y/o FOD, dado que en 9.6 a 38.7% de los mielocultivos se recupera algún microorganismo.^{4,14-16} La situación no es igual para inmunocompetentes, donde este estudio no se recomienda por su baja rentabilidad diagnóstica (entre 0-2%).¹⁶ Existen otras variables que también inciden en su rentabilidad entre las que destacan el modo de recolección de la muestra y ecología local. Los países del Mediterráneo, con alta incidencia de micobacterias y/o leishmaniasis, presentan tasas más elevadas de aislamiento microbiológico por esta vía, mientras que en zonas donde dichas afecciones no son prevalentes, la rentabilidad disminuye ampliamente.¹⁷

CONCLUSIÓN

Si bien este trabajo tiene las limitaciones presentadas, planteamos que el mielocultivo tiene una baja rentabilidad en términos de aislamientos microbiológicos e incidencia en la terapéutica respecto a los aislamientos en otros sitios, a lo que se suma que es un estudio invasivo y con tiempos hasta la obtención de resultados que no permiten el inicio de un tratamiento específico precoz.

REFERENCIAS

1. Fend F, Tzankov A, Bink K, Seidl S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M et al. Modern techniques for the diagnostic evaluation of the trephine bone marrow biopsy: methodological aspects and applications. *Prog Histochem Cytochem*. 2008; 42 (4): 203-252.
2. Quesada AE, Tholpady A, Wanger A, Nguyen AN, Chen L. Utility of bone marrow examination for workup of fever of unknown origin in patients with HIV/AIDS. *J Clin Pathol*. 2015; 68 (3): 241-245.
3. Duong S, Dezube BJ, Desai G, Eichelberger K, Qian Q, Kirby JE. Limited utility of bone marrow culture: a ten-year retrospective analysis. *Labmedicine*. 2009; 40 (1): 37-38.
4. Talbot EA, Reller LB, Frothingham R. Bone marrow cultures for the diagnosis of mycobacterial and fungal infections in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999; 3 (10): 908-912.
5. Benito N, Núñez A, de Górgolas M, Esteban J, Calabuig T, Rivas MC et al. Bone marrow biopsy in the diagnosis of fever of unknown origin in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med*. 1997; 157 (14): 1577-1580.
6. Nichols L, Florentine B, Lewis W, Sattler F, Rarick MU, Brynes RK. Bone marrow examination for the diagnosis of mycobacterial and fungal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 1991; 115 (11): 1125-1132.
7. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992; 41 (RR-17): 1-19.
8. Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, Llosa L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis—the value of bone marrow culture. *J Infect Dis*. 1986; 153 (1): 122-125.
9. Farooqui BJ, Khurshid M, Ashfaq MK, Khan MA. Comparative yield of *Salmonella typhi* from blood and bone marrow cultures in patients with fever of unknown origin. *J Clin Pathol*. 1991; 44 (3): 258-259.
10. Gasem MH, Dolmans WM, Isbandrio BB, Wahyono H, Keuter M, Djokomoeljanto R. Culture of *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi* from blood and bone marrow in suspected typhoid fever. *Trop Geogr Med*. 1995; 47 (4): 164-167.
11. İseri S, Bulut C, Yetkin MA, Kinikli S, Demiröz AP, Tülek N. Comparison of the diagnostic value of blood and bone marrow cultures in brucellosis. *Mikrobiyol Bul*. 2006; 40 (3): 201-206.
12. Volk EE, Miller ML, Kirkley BA, Washington JA. The diagnostic usefulness of bone marrow cultures in patients with fever of unknown origin. *Am J Clin Pathol*. 1998; 110 (2): 150-153.
13. Riley UB, Crawford S, Barrett SP, Abdalla SH. Detection of mycobacteria in bone marrow biopsy specimens taken to investigate pyrexia of unknown origin. *J Clin Pathol*. 1995; 48 (8): 706-709.
14. Hot A, Jaisson I, Girard C, French M, Durand DV, Rousset H et al. Yield of bone marrow examination in diagnosing the source of fever of unknown origin. *Arch Intern Med*. 2009; 169 (21): 2018-2023.
15. Fernández-Avilés F, Ribera JM, Romeu J, Batlle M, Navarro JT, Manterola JM et al. The usefulness of the bone marrow examination in the etiological diagnosis of prolonged fever in patients with HIV infection. *Med Clin (Barc)*. 1999; 112 (17): 641-645.
16. Madrigal-Jiménez HM, Hernández-Rivera G. Usefulness of bone marrow microscopic examination in HIV-infected patients with pancytopenia. *Gac Med Mex*. 2006; 142 (1): 13-17.
17. Mourad O, Palda V, Detsky AS. A comprehensive evidence-based approach to fever of unknown origin. *Arch Intern Med*. 2003; 163 (5): 545-551.