

Detecção do vírus Maedi-Visna, por Nested-PCR, no lavado bronco-alveolar de pulmões ovinos provenientes de abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza*

Gabrielle Rosemblit Martins¹, Maria Fátima da Silva Teixeira²⁺, Igor Ciríaco Barroso¹, Kelma Costa Souza³, Rebeca Cavalcante Marinho¹ e Rosivaldo Quirino Bezerra Junior⁴

ABSTRACT. Martins G.R., Teixeira M.F.S., Barroso I.C., Souza K.C., Marinho R.C. & Bezerra Junior R.Q. [Detection of maedi visna virus, by Nested-PCR, in bronchoalveolar lavage of sheep lungs from slaughterhouse in the Metropolitan region of Fortaleza.] Detecção do vírus Maedi-Visna, por Nested-PCR, no lavado bronco-alveolar de pulmões ovinos provenientes de abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(1):60-64, 2015. Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, Fortaleza, Ceará, CE 60120-000, Brasil. E-mail: mfteixeira@hotmail.com

Maedi-Visna is a disease multisystemic character caused by Maedi Visna Virus, a lentivirus belonging to the Retroviridae family, that preferentially infects cells of the mononuclear phagocyte system. The infected animal may show lesions in the lungs, joints, brain and mammary glands, singly or not, but usually the animal doesn't shows symptoms, and should be resorted to laboratory tests for diagnosis. Seeking to demonstrate the presence of this virus in herds in this region, the aim of this study was to detect the presence of the Maedi-Visna Virus in bronchoalveolar lavage of sheep lungs from slaughterhouse in the Metropolitan Region of Fortaleza. For this purpose, samples of sheep lungs were collected from slaughterhouse in the region, did bronchoalveolar lavage and cultivation of the cells obtained. These samples were subjected to DNA extraction and amplification by Nested-PCR. The presence of proviral DNA was confirmed in six of the 58 samples analyzed, demonstrating the presence of this infection in properties in the Metropolitan Region of Fortaleza.

KEY WORDS. Maedi-Visna, lung, PCR.

RESUMO. Maedi-Visna é uma doença de caráter multissistêmico causada pelo vírus Maedi-Visna, um lentivírus pertencente à família Retroviridae, que infecta preferencialmente as células do sistema fagocítico mononuclear. O animal infectado pode apresentar lesões nos pulmões, articulações, glândulas mamárias e cérebro, isoladamente ou não; porém, normalmente, o animal se apresenta assin-

tomático, devendo-se recorrer a testes laboratoriais para seu diagnóstico. Buscando-se demonstrar a presença desse vírus nos rebanhos dessa região, o objetivo desse trabalho foi detectar a presença do vírus Maedi-Visna no lavado bronco-alveolar de pulmões ovinos provenientes de abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza. Para tanto, foram coletadas amostras de pulmões ovinos em

* Recebido em 19 de outubro de 2012.

Aceito para publicação em 7 de março de 2014.

¹ Médico-veterinário, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Paranjana, 1700, Fortaleza, Ceará, CE 60120-000, Brasil. E-mails: rmgabrielle@hotmail.com; igorbarroso@yahoo.com.br; beca.marinho@hotmail.com - bolsistas CAPES e FUNCAP.

² Médico-veterinário, DSc. PPGCV, UECE, Av. Paranjana, 1700, Fortaleza, Ceará, CE 60120-000. ⁺ Autor para correspondência, E-mail: mfteixeira@hotmail.com - bolsista CNPq.

³ Zootecnista, PPGCV, UECE, Av. Paranjana, 1700, Fortaleza, Ceará, CE 60120-000. E-mail: kelma_zoo@hotmail.com - bolsista FUNCAP.

⁴ Médico-veterinário, PPGCV, UECE, Av. Paranjana, 1700, Fortaleza, Ceará, CE 60120-000. E-mail: junior_medvet2009@hotmail.com - bolsista CAPES.

abatedouro da região, realizado lavado bronco-alveolar e posterior cultivo das células obtidas. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA e amplificação por Nested-PCR. A presença do DNA pró-viral foi confirmada em seis amostras das 58 analisadas, demonstrando a presença dessa infecção em propriedades da Região Metropolitana de Fortaleza.

PALAVRAS-CHAVE. Maedi-Visna, pulmão, PCR.

INTRODUÇÃO

Maedi-Visna (MV) é uma doença que acomete ovinos, caracterizada por infecção lenta e progressiva, causada pelo vírus Maedi-Visna (MVV), um vírus não oncogênico pertencente à família Retroviridae e ao gênero *Lentivirus* (Pasick, 1998). Essa denominação originou-se na Islândia, e refere-se à dispnéia associada à pneumonia intersticial progressiva (Maedi) e a “desorientação” (Visna) devido à meningoencefalite (Sigurdsson 1954, Gudnadottir 1974, Dawson 1980).

Podem ocorrer quatro formas clínicas da doença: respiratória, nervosa, articular e mamária, associadas ou não (Callado et al. 2001, Moojen 2001). Maedi é a manifestação clínica mais comum da infecção, o animal apresenta perda de condição corporal, taquipnéia, dispnéia e emaciação. Outros sintomas como febre, tosse e corrimento nasal estão associados a uma infecção bacteriana secundária (Christodouloupoulos 2006).

Devido ao caráter crônico dessa enfermidade, são necessários testes laboratoriais para um diagnóstico preciso. Podem-se utilizar testes diretos como a reação em cadeia da polimerase (PCR), imunohistoquímica ou isolamento em cultivo celular, ou indiretos, com base na presença de anticorpos, como imunodifusão em gel de agarose (IDGA), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Demartini et al. 1999, Dantas et al. 2005).

A PCR possui alta sensibilidade e especificidade, sendo indicada para o diagnóstico em animais de alto valor zootécnico e para aqueles que o resultado de outros testes não tenham sido conclusivos (Moojen 2001). Vários trabalhos têm demonstrado o sucesso do uso dessa técnica na detecção do DNA pró-viral em fluidos e tecidos de um animal infectado, como em sangue, leite, sêmen, pulmões, SNC, úbere, articulações, rins e outros tecidos (Rimstad et al. 1993, Barlough et al. 1994, Wagter et al., 1998, Extramiana et al. 2002, Capucchio et al. 2003, Prezioso et al. 2003, Angelopoulou et al. 2006, Brellou et al. 2007).

O objetivo deste trabalho foi detectar a presença do vírus Maedi-Visna em amostras de lavado bronco-alveolar de pulmões ovinos naturalmente infectados, através da técnica de Nested-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Fortaleza é a capital do Estado do Ceará, estando localizada no litoral atlântico, altitude média de 21 m, latitude 3° 43' 02" e longitude 38° 32' 35", com área absoluta de 314,14 km². É a capital de maior densidade demográfica do país, com 8.001 hab./km², sendo o município mais populoso do Ceará. Seu clima é subtropical quente e úmido, com pluviosidade de 1.338 mm, temperatura média de 26 a 28 °C, sendo o período chuvoso compreendido nos meses de janeiro a maio (IPECE 2011).

Amostras

Foram coletadas aleatoriamente 58 amostras de pulmões de ovinos em abatedouro, localizado na Região Metropolitana de Fortaleza. Os pulmões foram coletados, após o abate, de forma asséptica, efetuando-se a oclusão da traqueia com barbante, os espécimes foram armazenados individualmente, e conservados em caixas térmicas durante o transporte ao Laboratório de Virologia da UECE (Labovir) para processamento e análises.

Lavado bronco-alveolar

Os pulmões foram submetidos a três processos de lavagem externas visando sua higienização utilizou-se água corrente, hipoclorito de sódio a 2% e água destilada. Inicialmente, foram observadas as características macroscópicas pulmonares como consistência, coloração, peso, tamanho e outras alterações patológicas visando correlacionar com as alterações encontradas em pulmões de ovinos com Maedi-Visna.

O lavado bronco-alveolar foi realizado utilizando-se 250 mL de solução fisiológica estéril (solução de cloreto de sódio 0,9%), por via intra-traqueal, realizando-se massagens em todos os lobos para possibilitar a eficiente penetração da solução. Após este processo o lavado foi coletado em tubo Falcon® de 15 mL estéril.

A amostra obtida foi filtrada em gaze estéril e submetida à centrifugação a 1500 g durante dez minutos. Após essa primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas no fundo do tubo foram transferidas para um novo tubo Falcon® de 15 mL (Adaptado de Luján et al. 1993). As amostras que apresentaram grande quantidade de hemácias foram submetidas a uma segunda centrifugação utilizando água destilada, visando à lise dessas hemácias e obtenção somente das células de interesse.

Inicialmente foi realizada a contagem de células viáveis, as transparentes e com membrana bem delimitada, utilizando-se o corante Azul de Tripán, em câmaras de Neubauer. A contagem total foi expressa pela média da contagem dos quatro quadrantes maiores da câmara de Neubauer multiplicado pela diluição (Adaptado de Luján et al. 1993). A análise dos dados referentes à conta-

gem de células do lavado bronco-alveolar foram realizadas no programa Excel (Microsoft Office), utilizando-se o teste t-student para comparação das médias.

Após verificação da viabilidade celular nas amostras, as células foram ressuspensas em meio essencial mínimo (MEM) acrescido de antibacteriano 1% (penicilina-estreptomicina), antifúngico 0,5% (anfotericina B) e soro fetal bovino 10%, sendo distribuídas em placas de 24 poços, e incubadas a uma temperatura de 37° C com atmosfera de 5% CO₂. Foram observadas diariamente durante um período de sete dias, após o qual foram congeladas a -20°C e descongeladas a 30°C, sendo esse procedimento repetido por três vezes. O material coletado foi armazenado em eppendorffs® de 2 mL e conservados a -20°C até subsequente uso.

PCR

O sobrenadante celular obtido e conservado a -20°C foi descongelado e utilizado para a etapa de extração do DNA pró-viral. Uma alíquota de um mL desse material, foi centrifugado 2000 g por 5 minutos, e o pellet obtido ressuspense em 500 µL de PBS e centrifugado a 2000 g por 5 minutos. Após essa lavagem, um mL de tampão hipertônico foi acrescido ao pellet obtido por dois minutos a temperatura ambiente seguido por centrifugação a 1500 g por 10 minutos. O DNA celular foi extraído utilizando-se 125 µL de tampão de PCR, sendo o material incubado a 56°C por 60 minutos com 2,5 µL de proteinase K em banho-maria. A proteinase K foi desnaturada a 95°C por 10 minutos. O DNA extraído foi estocado inicialmente a 4° C durante 24 horas, e posteriormente armazenado a -20°C até sua utilização (Adaptado de Castro 1998).

Para detecção do DNA pró-viral foi realizada a Nested-PCR utilizando *primers* para a região *gag*, sendo realizada em duas etapas de amplificação. Os *primers* utilizados para amplificar esse gene foram desenhados e confeccionados de acordo com Saltarelli et al. 1990. Os *primers* externos GEX5 (5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3') e GEX3 (5'-TCC-TACCCCATTAATTTGATCCAC-3') foram utilizados na primeira amplificação, e os *primers* internos GIN5 (5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3') e GIN3 (5'-ACCTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC-3') foram utilizados na segunda amplificação.

A amplificação foi realizada utilizando-se o termociclador (Biocycler®) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento dos *primers* a 56°C por um minuto e extensão do DNA a 72°C por 45 segundos com extensão final a 72°C por sete minutos. O primeiro e segundo round da PCR foram realizados em 35 ciclos sob as mesmas condições anteriores.

Para cada amplificação, um controle positivo e um controle negativo de MVV-K1514 foram utilizados em paralelo com as amostras. Após a amplificação os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio em tampão TBE.

Esse experimento foi submetido e aprovado pelo Co-

mitê de Ética para o Uso de Animais, da Universidade Estadual do Ceará, sob o número de protocolo 11224777-6/57.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem de células somáticas e viabilidade celular

Após separação das células do lavado bronco-alveolar, foi verificada a quantidade e a viabilidade das células obtidas. As amostras onde foi detectada a presença do MVV apresentaram um pequeno aumento na quantidade de células, com média de 2,98 x 10⁷, enquanto que as amostras negativas apresentaram média de 2,40 x 10⁷. Porém, quando comparadas estatisticamente, através do teste de t-student, utilizando-se o programa Excel (Microsoft Office), observou-se que esse resultado não foi significativamente diferente. Esse achado corrobora com o de Lujan et al. (1993), que também encontrou um leve aumento na celularidade do lavado bronco-alveolar de animais soropositivos, porém não era uma diferença significativa. Em uma análise mais detalhada, os mesmos autores, verificaram que os linfócitos e neutrófilos encontravam-se aumentados, enquanto que os macrófagos apresentavam-se em menor número, nos lavados dos animais infectados.

Concordando também com esse achado, Katsoulos et al. (2009), analisando o lavado bronco-alveolar de animais infectados pelo MVV, verificou que a porcentagem de macrófagos era significativamente menor, e a de linfócitos significativamente maior, quando comparados com o lavado de animais sadios.

Detecção do MVV no lavado bronco-alveolar

Um diagnóstico definitivo dessa doença deve associar a sintomatologia, o histórico clínico, achados macroscópicos e microscópicos característicos, a testes moleculares e sorológicos que comprovem a presença do vírus ou de anticorpos contra o mesmo (Christodouloupoulos 2006).

Estudos realizados têm demonstrado a presença do MVV em vários órgãos como pulmões, SNC, úbere, articulações, rins, fígado, coração, baço, medula óssea, e na membrana nictitante (Capucchio et al. 2003, Preziuso et al. 2003, Angelopoulou et al. 2006, Brellou et al. 2007), e em diferentes tipos de células como monócitos, macrófagos, fibroblastos, células dendríticas, epiteliais, endoteliais e adipócitos (Carozza et al. 2003, Brellou et al. 2007). Corroborando com esses resultados, a presença do DNA pró-viral foi confirmada, através da téc-

nica de Nested-PCR, em seis amostras de lavado bronco-alveolar das 58 analisadas neste trabalho, o que representa 10,34% de positividade (Figura 1), e demonstra a presença dessa infecção em propriedades da Região Metropolitana de Fortaleza. Justificando, assim, a necessidade de implementação de medidas de controle adequadas, visando obter uma melhor produtividade e condição sanitária desses animais.

Na Figura 1 observamos duas amostras positivas isoladas de material procedente do lavado bronco-alveolar de pulmões ovinos provenientes de abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza, o que confirma a existência da virose no rebanho cearense, demonstrando a necessidade de implementação de medidas de controle eficazes visando impedir a disseminação da mesma.

A persistência do vírus Maedi-Visna dentro das células do sistema fagocítico mononuclear como alvo primário e expressão viral somente ativada após a diferenciação do monócito a macrófago favorece a presença do vírus dentro dessas células em estado latente por um período indeterminado (Christodoulopoulos 2006). Dessa forma, nesse experimento após obtenção dos leucócitos através do lavado bronco-alveolar, e posterior cultivo, foi possível detectar a presença do material genético do vírus utilizando a amplificação da região correspondente ao gene *gag*, um amplicon de 190 pb, compatível com o de Maedi-Visna.

Análise macroscópicas dos pulmões

Macroscopicamente, os pulmões os pulmões do presente estudo em que o MVV foi detectado, apresentaram-se duas a três vezes mais pesados que pulmões sadios, com coloração variando de rosa a esbranquiçado. Quanto à consistência, os pulmões com lesões mais extensas apresentaram aspecto borrachoso, e os pulmões com poucas lesões, apresentaram aspecto esponjoso, similar ao aspecto de um pulmão sadio. As principais lesões encontradas foram focos hemorrágicos, aspecto hepatizado, áreas de enfisema, e bordas esbranquiçadas (Figura 2), alterações compatíveis com as lesões causadas por esse vírus, e que corroboram com os achados de Azizi et al. (2012), que analisou 50 pulmões coletados em abatedouro, e observou que os órgãos infectados apresentavam consistência borrachosa e firme, coloração variando de rosa a branco, duas a três vezes mais pesados, lesões nos lobos diafragmáticos, aumento dos linfonodos associados, e lesões esbranquiçadas com diâmetro variando de 1-2 mm.

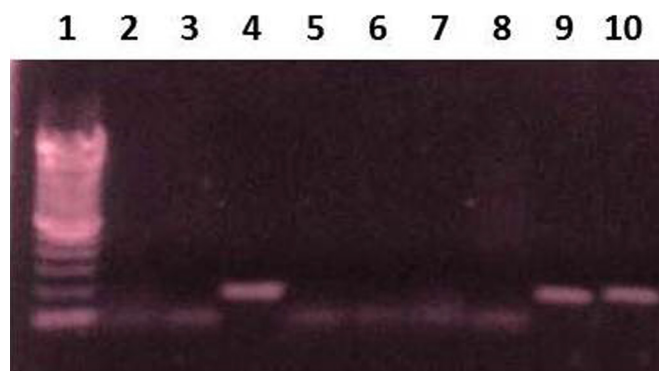


Figura 1. Detecção do DNA pró-viral do MVV nas amostras de lavado bronco-alveolar. Linha 1 corresponde ao marcador molecular 100pb, linha 2 controle negativo, linha 10 ao controle positivo, linha 4 e 9 as amostras positivas.

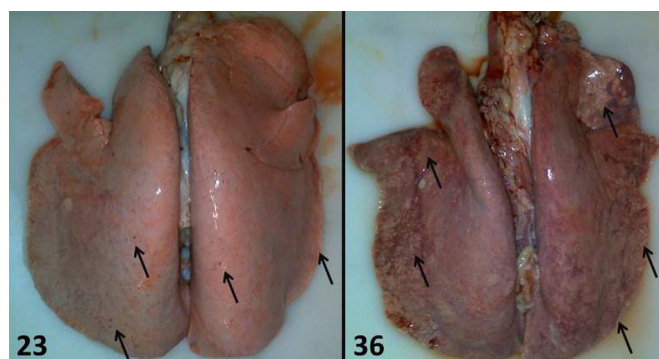


Figura 2. Aparência macroscópica dos pulmões ovinos infectados pelo MVV. Pulmão 23 apresentando coloração esbranquiçada, aumento de tamanho, pontos hemorrágico e bordas esbranquiçadas. Pulmão 36 com coloração rosa, áreas de enfisema, pontos hemorrágicos e bordas esbranquiçadas.

CONCLUSÃO

Amostras do lavado bronco-alveolar de ovinos naturalmente infectados foram positivos para Nested-PCR de lentivírus de pequenos ruminantes, apresentando amplicon de aproximadamente 190 pares de base e lesões macroscópicas compatíveis com as causadas por esse vírus.

Agradecimentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. A Universidade Estadual do Ceará por disponibilizar condições técnica e pessoal para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Angelopoulou K., Brellou G.D. & Vlemmas I. Detection of Maedi-Visna Virus in the kidneys of naturally infected sheep. *J. Comp. Pathol.*, 134:329-335, 2006.
- Azizi S., Tajbakhsh E., Fathi F., Oryan A., Momtaz H. & Goodarzi M. Maedi in slaughtered sheep: A pathology and polymerase chain reaction study in southwestern Iran. *Trop. Anim. Health Produc.*, 44:113-118, 2012.

- Barlough J., East N., Rowe J.D., Vanhoosear K., Derock E., Bigornia L. & Rimstad E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods*, 50:69-77, 1994.
- Brellou G.D., Angelopoulou K., Poutahidis T. & Vlemmas I. Detection of Maedi-Visna Virus in the liver and heart of naturally infected sheep. *J. Comp. Pathol.*, 136:27-35, 2007.
- Brodie S.J., De La Concha-Bermejillo A. & Snowden G.D. Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: a review. *Small Rumin. Res.*, 27:1-17, 1998.
- Callado A.K.C., Castro R.S. & Teixeira M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.*, 21:87-97, 2001.
- Capucchio M.T., Sanna E., Sanna M.P., Farigu S., Minelli R. & Guarda F. Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. *J. Comp. Pathol.*, 129:37-43, 2003.
- Carrozza M.L., Mazzei M., Bandecchi P., Arispici M. & Tolari F. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *J. Virol. Methods*, 107:121-127, 2003
- Castro R.S. Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1998. 132p. (Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br>>)
- Christodoulouopoulos G. Maedi-Visna: Clinical review and short reference On the disease status in Mediterranean countries. *Small Rumin. Res.*, 62:47-53, 2006.
- Dantas T.V.M., Araújo S.A.C., Silva J.B.A., Ricarte A.R.F. & Teixeira M.F.S. Formas de diagnóstico da Maedi-Visna. *Ciência Animal*, 15:89-97, 2005.
- Dawson M. Maedi/Visna: a review. *Vet. Rec.*, 106:212-216, 1980.
- DeMartini J.C., Halsey W., Boshoff C., Dennis Y. & Howell M.D. Comparison of a Maedi-Visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 71:29-40, 1999.
- Extramiana A.B., Gonzalez L., Cortabarría N., Garcia M. & Juste R.A. Evaluation of a PCR technique for detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissues samples naturally infected sheep. *Small Rumin. Res.*, 44:109-118, 2002.
- Gudnadottir M. Visna-Maedi in sheep. *Progr. Med. Virol.* 18:336-349, 1974.
- IPECE. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. Disponível em: <http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/perfil_basico/pbm-2011/Fortaleza.pdf>. Acesso em 10 de outubro de 2012.
- Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. *Patologia Veterinária*. 6ª ed. Manole, São Paulo, 2000. 341p.
- Katsoulos P.D., Christodoulouopoulos G., Kontopidis G., Minas A., Tzivara A. & Kritas S.K. Leukocyte counts in bronchoalveolar lavage fluid obtained from normal and Maedi-Visna-infected sheep. *Vet. Clin. Pathol.*, 38/3:397-402, 2009.
- Luján L., Begara L., Collie D.D.S. & Watt N.J. Phenotypic analysis of cells in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of maedi visna-infected sheep. *Clin. Exp. Immunol.*, 91:272-276, 1993.
- Moojen V. Maedi-Visna dos ovinos, p.138-144. In: Riet-Corrêa F. (Ed.), *Doenças de Ruminantes e Equinos*. v.1., Varela, São Paulo, 2001.
- Pasick J. Maedi-Visna virus and caprine Arthritis-Encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnoses. *Can. J. Vet.*, 62:241-244, 1998.
- Pinheiro R.R. *Vírus da artrite encefalite caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará*. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. 115p. (Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br>>)
- Prezioso S., Taccini E., Rossi G., Renzoni G. & Braca G. Experimental Maedi Visna Virus infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *Europ. J. Histoch.*, 47:373-378, 2003.
- Rimstad E., East N.E., Tørtén M., Higgins J., Derock E. & Pedersen N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, 54:1858-1862, 1993.
- Saltarelli M., Querat G., Konings D.A., Vigne R. & Clements J.E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virol.*, 179:347-364, 1990.
- Sigurdsson B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootiological and a pathological study. *Brit. Vet. J.*, 110:225-270, 1954.
- Wagter L.H.A., Jansen A., Bleumink Pluym J.A., Lenstra L.A. & Houwers D.J. PCR detection of lentiviral gag segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet. Res. Commun.*, 22:355-362, 1998.