

## AKUT SOLUNUM YOLU ETKENLERİNİN TANIMLANMASINDA YENİ BİR YÖNTEM: VİRAL SOLUNUM YOLU PANELİ

Akut solunum yolu infeksiyonları, her yıl tüm dünyada infeksiyon hastalıklarına bağlı morbidite ve mortalitenin en sık etkenidir. Bu infeksiyonların yaklaşık %80'i virus kaynaklıdır. Hastalık tüm yaş gruplarında görülebilir, ancak çocuklarda erişkinlerden daha sık görülür (1). Yaşamın ilk yılında, yaklaşık %30 oranında infant, akut solunum yolu infeksiyonu geçirmektedir. Bu oran okul çocukluğunda %5-10'a, sağlıklı erişkinlerde %5'e inmekte, yaşlılıkta tekrar %17'ye yükselmektedir (2). Virusların yol açtığı rinit, farenjit, larenjit gibi üst solunum yolu infeksiyonlarına sekonder olarak otitis media, astım atakları, bronşit, bronşiolit, pnömoni gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Klinik tablo belirsiz infeksiyondan ölümcül infeksiyona kadar değişebilir. Tüm dünyada akut solunum yolu infeksiyonları infant ve çocuklarda hospitalizasyonun en önemli sebebi iken, gelişmekte olan ülkelerde özellikle

pnömoniye bağlı ölüm oranı 5-10 kat daha fazla bildirilmektedir (1). Dünya Sağlık Örgütü 5 yaş altındaki çocuk ölümlerinin yaklaşık %20'sinin alt solunum yolu infeksiyonları sebebiyle olduğunu rapor etmiştir (3). Çok genç ve çok yaşlı kişilerde, bağışıklık sistemi baskılanmış olanlarda, altta yatan kronik kardiyak ve pulmoner hastalığı olanlarda sıklıkla pnömoni ve buna bağlı olarak solunum yetmezliği gelişmektedir. Viral solunum yolu infeksiyonlarına sekonder olarak %30-40 oranında ortaya çıkan bakteriyel sinüzit, otitis media ve pnömoni atakları, morbidite ve mortaliteyi önemli oranda artırmaktadır. Üst solunum yolu infeksiyonları (ÜSYİ), okuldan devamsızlık, çok sayıda sağlık merkezine başvuru, gereksiz antibiyotik kullanımı gibi önemli sosyal kayıplara yol açmaktadır. Viral üst solunum yolu infeksiyonlarının sıklıkla oluşturduğu akut otit tablosu, en sık antibiyotik kullanımına

neden olan klinik tablodur (1). Bu nedenlerle akut solunum yolu infeksiyonlarında doğru etkeni saptamak çok önemlidir.

### Doğru tanı ile;

1. Hastada uygun antiviral ilaç kullanımını sağlar. Örneğin influenza infeksiyonlarında “oseltamivir” tedavisine erken başlamak hastalığın komplikasyonlarını önlemekte çok önemlidir. Aynı zamanda gereksiz antibiyotik kullanımı da engellenmiş olur.

2. Saptanan virus için kullanılabilir uygun antiviral ajan olmasa da, tanı koymak için gereksiz test yapılmasını engeller, maliyeti düşürür.

3. Hastalık etkeni olarak dolaşan virusların saptanması toplum sağlığı politikalarının doğru organizasyonunu sağlar.

4. Etkeni belirlemek, çoğunlukla damlacık yoluyla ve çok hızlı yayılan virüslere karşı uygun kontrol ve korunma programları belirleyerek, nosokomiyal salgınlara önlenmesini sağlar.

### **Akut Solunum Yolu Etkeni Olan Viral Patojenler**

Klinik açıdan önemli viral respiratuvar etkenler tablo 1’de görülmektedir.

Influenza, tek sarmallı RNA virusudur. Kış aylarında ortaya çıkan salgınlarda akla gelen

**Tablo 1.** Klinik açıdan önemli viral respiratuvar etkenler

Familiya	Genus	Tip	Sebebi Olduğu Hastalık
Adenoviridae	Mastadenovirus	Human adenovirus	Farenjit, pnömoni, gastroenterit, konjunktivit
Coronaviridae	Coronavirus	Human coronavirus’ları, SARS coronavirus’ları	Soğuk algınlığı, Ciddi akut respiratuvar sendrom (SARS)
Orthomyxoviridae	Influenza A virus	Influenza A, Avian Influenza A	Grip, bronşiolit, pnömoni
	Influenza B virus	Influenza B	Grip
Paramyxoviridae	Metapneumovirus	Human metapneumovirus	Farenjit, bronşit, pnömoni
	Pneumovirus	Human respiratuvar sinsiyal virus (RSV)	Krup, bronşiolit, pnömoni (özellikle yenidoğan ve çocuklarda)
	Respirovirus	Human parainfluenza virus tip 1,3	Krup, nonspesifik üst solunum yolu infeksiyonları, bronkopnömoni (özellikle çocuklarda)
	Rubulavirus	Human parainfluenza virus tip 2,4	Krup, farenjit ve soğuk algınlığı (özellikle çocuklarda)
Parvoviridae	Bocavirus	Human bocavirus	Bronşiolit, pnömoni gibi çeşitli respiratuvar infeksiyonlara yol açtığı düşünülmektedir.
Picornaviridae	Rhinovirus	Human rhinovirus A ve B	Soğuk algınlığı

ilk etken olmalıdır. Üst solunum yolu infeksiyonu sonrasında hastaların %20'sinde pnömoni gelişir. Genellikle yaşlıları etkileyen pnömoni yapar. Hastaların %80'den fazlası 65 yaşın üzerindedir. Çocuklarda, kronik hastalığı olan, immun sistemi baskılanmış, kardiyak ve pulmoner hastalığı bulunan kişilerde pnömoniyeye dönüşme oranı yüksektir.

Respiratuvar sinsisyal virus (RSV), yenidoğan ve çocuklardaki en sık viral pnömoni ve bronşiolit etkenidir. Hastaneye yatan çocuklardaki viral pnömonilerin dörtte birinden, üç yaş altı pnömonilerin ise yarısından sorumludur. Ancak özellikle yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar olmak üzere, erişkinlerde de patojen olma özelliği giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Kış ve bahar aylarında lokal epidemiler yapmaktadır. Aile içinde ve kreşlerde kişiden kişiye bulaşabildiği gibi, nozokomiyal salgınlar da bildirilmektedir. RSV'nin A ve B olmak üzere iki alt grubu vardır. Tip A daha ağır seyreden infeksiyonlara neden olur.

Parainfluenza virus yenidoğan grubunda, hastaneye yatış gerektiren viral pnömonilerde RSV'den sonra ikinci sıklıktaki patojendir. Parainfluenza tip I ve tip II'ye bağlı epidemiler bahar aylarında saptanır. Özellikle PIV 1 ve 3 sıklıkla küçük çocuklarda gözlemlenen bir alt solunum yolu infeksiyonu olan laringotrakeobronşitin (Krup Sendromu) en sık görülen etkenidir. Erişkinlerdeki viral pnömonilerin %15'inden parainfluenza virusu sorumludur. Herpes simplex virus, özellikle bağışıklığı

baskılanmış hastalarda pnömoni etkeni olarak saptanmaktadır.

CMV, toplum genelinde yaygın, belirtisiz infeksiyon yapar. Ancak %6 oranında pnömoni gelişebilir. Ancak kemik iliği transplantasyonu, organ transplantasyonu yapılan ya da HIV pozitif hastalardaki pnömonilerin dörtte biri bu etkene bağlıdır.

VZV'nün primer infeksiyonu varisella (suçiçeği) dir. Ancak varisella sonrası %5-14 oranında pnömoni gelişebilir.

### ***Yeni Tanımlanmış Viral Etkenler***

1990' lı yıllardan bu yana viroloji alanında moleküler testlerin yardımıyla pek çok gelişme kaydedilmiştir. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, akut solunum infeksiyonuna neden olan birçok yeni solunum ilişkili virus saptanmasına olanak sağlamıştır. Bunlardan bazıları metapneumovirus, ciddi akut respiratuvar sendrom-coronavirus (SARS-Cov), coronavirus Hollanda (HCoVNL63), coronavirus-Hong Kong (HCoV-HKU1), bocavirus, adenovirus AD14, kuş ilişkili influenza A H5N1, H7N7, H7N3, domuz kaynaklı influenza A (H1N1), Hendra ve Nipah viruslarıdır (1).

Human metapnömovirus (HMV), ilk olarak Hollanda'da 2001 yılında tanımlanmış, paramiksovirus ailesinden tek sarmallı bir RNA virusudur. RSV'ye benzer bir klinikle seyrederek, çocuklarda bronşiolit, pnömoni ve üst solunum yolu infeksiyonlarına neden olur. Çoğunlukla erken çocukluk döneminde

geçirilir. Hong Kong'da alt solunum yolu infeksiyonu sebebiyle hastaneye yatırılan hastaların izlendiği 2003 tarihli bir çalışmada, % 6 HMV, % 8 RSV, % 8 influenza etken olarak saptanmıştır (4).

Coronavirüsler, ilk defa ÜSYE etyolojisini çalışan araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. İlk başta iki ana serolojik grup tanımlanmıştı; 229E ve OC43, daha sonra 2003'de SARSCoV, 2004'de Coronavirus NL63 ve 2005'de Coronavirus HKU1 bulundu. SARSCoV Kasım 2002-temmuz 2003 arasında 8000 kişiyi infekte ederek, 32 ülkede 800 kişinin ölümüne yol açmıştır. Çocuklarda, özellikle 12 yaş altında daha hafif seyredabilen SARSCoV infeksiyonunun, ateşli bir alt solunum yolu infeksiyonu olarak başladığı, bunu izleyen 3-7 gün içerisinde dispne ve öksürüğün ortaya çıktığı ve bu evreden sonra şiddetli solunum yetmezliği görüldüğü bildirilmiştir. Çocuk ve ergenlerde bu virusa bağlı ölüm bildirilmemiştir (1).

Coronavirus NL63 ÜSYİ ve ASYİ'lerinin %1.7-9.3'ünde etken olarak bildirilmektedir. Coronavirus HKU1 ise %1-3.1 oranında solunum yolu infeksiyonuna neden olmaktadır (1).

Adenovirüsün insana özgü 51 serotipi vardır, ancak şiddetli seyreden hastalık tablosunun çoğunda tip 3, 4 ve 7 etkendir. Sıklıkla farenjit, adenit ve konjunktivit etkenidir. Pnömoni daha enderdir, ancak nekrozitan bronşit/bronşiyolit yapabilir. Adenovirüs AD14'ün, Kasım 2007'de ABD'nin dört eyaletinde ciddi infeksiyona yol açtığı bildirilmiştir (1).

## **Akut Solunum Yolu İnfeksiyonlarına Yol Açan Virüslerin Tanımlanması**

Klinik olarak viral pnömonileri ayırt etme olanağı yoktur. Ancak özellikle epidemiler sırasında viral pnömonileri akla getirmek gerekir. Viral etkenleri belirlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

1. Viral kültür
2. Sitolojik değerlendirme
3. İmmunolojik testler
4. Moleküler yöntemler

Viral kültürler etkenin varlığını ve türünü kesin olarak ortaya koyar. Viral etkenlerin identifikasyonunda geçmişten günümüze "altın standart" olarak bildirilmektedir (5, 6,7,8). Hücre kültüründe sitopatik etki ya da influenza için embriyonlu tavuk yumurtasında hemadsorbsiyon gözlemlenerek tanı konur. Ancak kültürdeki sitopatolojik etkinin saptanması günler, haftalar boyu sürebilir, kültürün devamlılığı olmayabilir. Kültür pozitifliği viral infeksiyon için tanısal olsa da duyarlılık düşüktür. Pozitif sitopatik etki saptandığında pasajlar alınarak, subkültürlerle konfirme edilmesi gerekir. Ne var ki, bu yöntem zahmetli, zaman alan ve pahalı bir yöntemdir (1,5).

Sitolojik ve histopatolojik değerlendirme için solunum yolu sekresyonları, bronkoalveolar lavaj sıvısı, akciğer doku örnekleri kullanılır. Örneklerde inklüzyon cisimcikleri aranır. Genel olarak DNA virüsleri intranükleer, RNA virüsleri ise sitoplazmik inklüzyon cisimciklerine neden



olur. İnklüzyon cisimcikleri viral infeksiyonlar için tanısal olsa da duyarlılığı düşüktür. İnklüzyon cisimciğinin görülmemesi tanıyı ekarte ettirmez (1,5).

İmmunolojik testler antijen ve antikor saptama amaçlı geliştirilmiştir. Antijen, doğrudan hastadan alınan örneklerde aranır. Testler immunfloresans (IFA), enzim immunoassay (EIA) ya da immunokromatografik yöntemlerle 2-3 saat içinde sonuç verebilir. Duyarlılık ise kullanılan yöntemle göre değişebilmektedir. IFA duyarlılığı RSV ve influenza için %87-93, adenovirus ve parainfluenza için %51-67 olarak bildirilmektedir (5). Son yıllarda geliştirilen immunokromatografik yöntemlerle RSV, Influenza A ve B viruslarının antijenleri çok hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Bu yöntemler özellikle salgın zamanlarında hızlı tanı koyabilmek için tercih edilmektedir. Genel olarak antijen saptama testlerinin duyarlılığı viral kültürlerden daha düşüktür. Buna karşılık antijenler, kültürde üremenin artık saptanmadığı dönemlerde, haftalar sonra bile saptanabilmektedir. Uygulamadaki pratiklik ve sonuç alma süresinin kısa oluşu sebebiyle viral kültürlerle tercih edilmektedir.

Antikor testlerinin de tanısal önemi büyüktür. Ancak antikor yanıtının oluşması ve antikor titresinin artışının saptama gerekliliği hızlı tanı koymayı güçleştirmektedir (1).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir gen amplifikasyon yöntemidir; tanı koymada yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir.

Kısa zamanda tanı konulabilmesi bir diğer avantajıdır. Konvansiyonel yöntemlerle gösterilemeyen rinovirus, coronavirus, metapneumovirus gibi solunum sistemi virusları RNA sekanslama gibi PCR yöntemleri ile tanımlanabilmektedir. Viral genom üzerinde odaklanarak, moleküler yöntemlerin özgüllüğü ve duyarlılığı önemli ölçüde artırılmaktadır. RNA virusları için kullanılan temel amplifikasyon tekniği, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)'dur. Teorik olarak bu teknik 24 saat içinde tek bir virus tespit etme özelliğine sahiptir. Amplifikasyon sekanslaması reaksiyon tamamlandığında durdurulabilir ya da real-time PCR ile sekanslama sürdürülebilir. Real-time PCR virusun kantitasyonunu sağlayabilmektedir (1,5).

Viral solunum yolu infeksiyonlarının tanısında moleküler testler büyük ilerleme göstermiştir. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) non-nükleik asit bazlı testlerden daha duyarlıdır. Artmış duyarlılık infekte olan hastaların tanısının daha hızlı ve doğru konulmasını sağlar. Özellikle infeksiyon seyri sırasında, virus konsantrasyonunun daha düşük olduğu aşamalarda, konvansiyonel yöntemlerle etken saptanamayabilir. SARS, kuş gribi H5N1 gibi yeni viral etkenler ortaya çıktıklarında potansiyel pandemi riski oluşturmuşlardır. Bu durumlarda nükleik asit amplifikasyon testleri etken olan ajanı belirlemede ve izlemede önemli rol üstlenmişlerdir. Gelecekte de önemlerini sürdüreceklerdir (6).

## ***Solunum Yolu Viruslarının Tanımlanmasında Yeni Bir Yöntem : Multiplex PCR Testleri***

Solunum yolu virusları tespitinde kullanılan NAAT'leri pek çok faktörden etkilenmektedir. Fazla ya da az miktarda örnek ekstraksiyonu sonuçta önemli farklılıklar yaratabilir, bu sebeple hangi özellikte ve ne kadar örnek alınacağına iyi belirlenmiş olması gerekir. Solunum yolu virusları RNA virüsü ve DNA viruslarına göre daha sık mutasyona uğradıkları için, yeni serotip ve genotipler açığa çıktığında belirlenmiş oligonükleotid primerleri veya problemleri yeterli olmayabilir. Bu nedenle tüm NAAT testleri için geçerli suşların kullanılması sağlanmalı ve düzenli olarak izlenmelidir. Örneğin influenza ile enfekte olan bir kişinin örneğinde RT-PCR sonucunun negatif saptanması, gerekli önlemlerin alınmasını engelleyerek,

nosokomiyal salgınla karşılaşma riskine yol açmaktadır. Aynı zamanda viral solunum yolu hastalıkları birden fazla etkenle meydana gelebilmektedir. Bu durumlarda tek etkeni belirleyen uniplex PCR testleri ile tanı koymak maliyet artışı ve zaman kaybına yol açmaktadır (5). Bu durum immunfloresans ve EIA gibi konvansiyonel yöntemler için de geçerlidir. Ayrıca son yıllarda keşfedilen NL63, HKU1, HCoV gibi virusların tanısının konulması için henüz geliştirilmiş immunolojik yöntemler bulunmamaktadır.

Son yıllarda geliştirilmiş olan multiplex PCR testleri aynı anda birden fazla solunum yolu virusunu saptama özelliğine sahiptir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Multiplex PCR yöntemi ile saptanabilen viral solunum yolu virusları

	<b>VİRUS*</b>
A PANELİ	Human metapneumovirus RNA
	Human adenovirus DNA
	Human coronavirus 229E/NL63 RNA
	Human parainfluenza 2 RNA
	Human parainfluenza 3 RNA
B PANELİ	Human parainfluenza 1 RNA
	Influenza B virus RNA
	Human coronavirus OC43/HKU1 RNA
	Human rhinovirus A/B/C RNA
Influenza Paneli	Human respiratory syncytial virus A RNA
	Human respiratory syncytial virus B RNA
	Influenza B virus RNA
	Pandemic H1N1 virus RNA

\*Yöntem 3 panelden oluşmaktadır, toplam 12 virus aranmaktadır.

Bu yöntem tek bir test ile rinovirus, RSV gibi bilinen virusların yanı sıra yeni keşfedilen virusları da saptayabilmektedir. Tek bir test ile tanı koyabilmek maliyet ve zaman açısından önemlidir. Multiplex PCR yönteminin geliştirilmesinden sonra yapılan çalışmalarda aynı anda iki ya da üç etkenle gelişen viral solunum yolu hastalıklarının oranının % 8-11 olduğu bildirilmektedir (1). Aynı anda birden fazla virusun etken olduğu respiratuvar viral hastalıklar, özellikle genç hastalarda görülmektedir. Birden çok virusun etken olduğu hastalıklarda klinik daha ağır seyretmekte, daha yüksek ateş, daha uzun hastanede kalış gerçekleşmektedir (7). Multiplex PCR testleri viral solunum yolu infeksiyonlarının epidemiyolojisini belirlemede önemli katkılar sağlamaktadır. Viral etkenlerin takip edilmesi mevsimsel özellikler, coğrafi dağılım ve risk gruplarını belirlemeye yardımcı olmaktadır. Multiplex PCR testlerinin kullanımı, klasik test yöntemlerine göre respiratuvar virusların tanımlanmasını %30-50 oranında artırmıştır (1). 2010 yılında Arens ve ark.'nın bildirimine göre konvansiyonel yöntemlere göre %35.3 fazla saptayabilmektedir (6). Bu testlerin klinik performansları, duyarlılık ve özgüllükleri konusunda sürekli yeni çalışmalar yayımlanmaktadır. Multiplex PCR yönteminin özgüllüğü % 96.7 ile 100 oranında, duyarlılığı ise %95.1 ile %100 oranında bildirilmektedir (5,9,10.). Sallene ve ark. respiratuvar viral solunum yolu salgınlarında multiplex PCR yönteminin immunfloresans ve uniplex PCR yöntemine göre daha duyarlı, hızlı tanı

konulmasına uygun ve her bir viral etken için tek tek test yapılması gereken diğer testlere göre daha ekonomik olduğunu bildirmişlerdir (11). 2011 yılında Ali ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada konvansiyonel yöntemler yerine, RT-PCR yöntemiyle multiplex PCR yöntemini karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada her iki yöntemin yakın duyarlılıkta olduğu, ancak multiplex PCR yöntemiyle metapneumovirus ve RSV, RT-PCR yöntemiyle ise influenza A virusunun daha çok saptandığı bildirilmiştir (8).

Multiplex PCR yöntemiyle çalışılan viral solunum yolu panelinde, semptomatik hastalardan alınan nasal sürüntü, nazofaringeal aspirat, nazofaringeal sürüntü ya da bronkoalveolar lavaj örneklerinde çalışılmaktadır. Semptomların başladığı ilk günlerde, yani viral yükün yüksek olduğu dönemde testin çalışılması, saptanabilirlik oranını yükseltmektedir (7).

Moleküler tanı yöntemleri, altın standart kabul edilen "viral kültür", immunfloresans ve EIA gibi konvansiyonel yöntemlerin yerini almaktadır.

Son on yılda keşfedilen 6 yeni virus sebebiyle, respiratuvar viral hastalıkların tanımlanmasında hassas ve özel testlere gereksinim giderek artmaktadır. Yeni respiratuvar virusların keşfedilmesine de devam edileceği bir gerçektir. Multiplex PCR yöntemiyle çalışılan viral solunum yolu paneli, akut solunum yolu hastalıklarında hızlı tanı koymada klinisyenlere önemli katkıda bulunacaktır.

## Referans Kaynaklar

1. Mahony J.B. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. Clin Microbiol Rev. 2008 October; 21(4):716-747.
2. Somer A. Metapneumovirus. ANKEM Derg 2006;20 (Ek 2):234-239.
3. World Health Organization. Acute respiratory infection in children. [www.who.int/fch/depts/resp\\_infections/en/](http://www.who.int/fch/depts/resp_infections/en/).
4. Peiris JS., Tang WH., Chan KH., et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. Emerg Infect Dis. 2003; 9:628-633.
5. Kim S. R., Ki C., Lee N. Y. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. Journal of Virological Methods 156 (2009); 111-116.
6. Arens M. Q., Buller R. S., Rankin A., Mason S., Whetsell A., Agapov E., Lee W., Storch G A. Comparison of the Eragen Multi-Code Respiratory Virus Panel with Conventional Viral Testing and Real-Time Multiplex PCR Assays for Detection of Respiratory Viruses J Clin Microbiol. 2010 July; 48 (7):2387-2395.
7. Brittain-Long R., Westin J., Olfsson S., Lindh M., Andersson L. Prospective evaluation of novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens-Duration of symptoms significantly affects detection rate Journal of Clinical Virology 47 (2010): 263-267.
8. Ali S A., Gern J E., Hartert T V., Edwards K M., Griffin M R., Miller E K., Gebretsadik T., Pappas T., Lee W., Williams J. Real-world comparison of two molecular methods for detection of respiratory viruses Virology Journal 2011, 8:332.
9. Drews S J., Blair J., Lombos E., Delima C., Burton L., Mazzulli T., Low D E. Use of Seplex RV detection Kit for Surveillance of Respiratory Viral Outbreaks in Toronto, Ontario, Canada. Annals of Clinical & Laboratory Science 38:376- 379 (2008).
10. Rebbapragada A., Allen V., Farrel d., Gharabaghi F., Gubbay J., Guyard C., Lombos E., Mazzulli T., Moussa G., Perusini S J., Richardson S., Low D., Drews S J. Comparison of Multiple Commercial Assays for the Detection of Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus (SOIV) 26 th International Congress of Chemotherapy and Infection (June 18-21, 2009, Sheraton Centre Toronto Hotel, Toronto, Canada).
11. Wong S., Pabbaraju K., Lee B L., Fox J D. Enhanced Viral Etiological Diagnosis of Respiratory System Infection Outbreaks by Use of a Multitarget Nucleic Acid Amplification Assay j Clin Microbiol. 2009 December; 47 (12): 3839-3845.

