

PROTEINA C REACTIVĂ ȘI PROCALCITONINA ÎN STABILIREA INFECȚIEI POSTOPERATORII ȘI FOLOSIREA PROCALCITONINEI ÎN APRECIEREA EVOLUȚIEI SEVERE A SEPSISULUI POSTOPERATOR

LORANT KISS¹, GHEORGHE NICOLAE SÂRBU², ALINA BEREANU³, ROLAND KISS⁴

^{1,2,3,4}Universitatea „Lucian Blaga” din Sibiu, Spitalul Clinic Județean de Urgență Sibiu

Cuvinte cheie: APACHE II – scor, procalcitonină, sepsis, proteina C – reactivă

Rezumat: Proteina C reactivă (PCR) este o proteină de fază acută, folosită pentru diagnosticarea prevenției unei inflamații. Creșterea concentrației serice al PCR poate fi observată în traumă, inflamație, infecție sau patologie neoplazică. Mai multe studii au evaluat nivelul seric al procalcitoninei (PCT) ca indicator în dezvoltarea sepsisului, necrozei infectate. Metodă: nivelul seric al PCR și scorul APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evolution) a fost determinat în ziua stabilirii sepsisului, la 160 de pacienți după intervenții abdominale și toracice și într-un număr similar (n≈160) analizate rezultatele pre și postoperatorii al nivelului PCR, luând în considerare comorbiditatea și procedeuul chirurgical. Rezultate: pacienții prezentând comorbiditate au avut mai frecvent nivel crescut al PCR. În 68% din pacienți, în perioada primelor trei zile postoperatorii a fost cerută determinarea PCR. În acest studiu am observat un vârf al nivelului seric de PCR în ziua a 2-a sau a 3-a postoperatorii, după care nivelul seric scade. În studiul de față, analiza multivariată a arătat că scorul APACHE II și nivelul PCR reprezintă markeri predictivi precoce în indicarea sepsisului letal sever. În acest studiu, 70% dintre pacienții cu risc crescut au decedat prin sepsis. Importanța predictivă a ambilor parametri (PCR, scorul APACHE II) în combinație a fost superioară în raport cu cea a fiecărui parametru luat separat. Concluzii: în analiza multivariată atât scorul APACHE II, cât și PCT au fost identificați ca indicatori precoce ai sepsisului sever și al sepsisului letal. Ghidul NICE nu recomandă determinarea nivelului seric al PCR preoperatorii, iar nivelurile postoperatorii ale PCR prezintă un rol limitat în screeningul infecției. Nivelul seric al CRP poate fi utilizat în diagnosticul infecției în perioada după primele trei zile postoperatorii. Folosirea de rutină al CRP-ului în preoperatorii și în primele 2-3 zile postoperatorii nu se recomandă.

Keywords: APACHE II score, procalcitonin sepsis, C – reactive protein

Abstract: C – Reactive Protein (CRP) is an acute phase protein used to diagnose the presence of inflammation. A rise in CRP concentration in serum may be present in trauma, inflammation, infection, or cancer pathology. Many studies have evaluated severe levels of procalcitonin (PCT) as a prediction in the development of sepsis, infected necrosis. Methods: Levels of PCT and APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evolution) were assessed on the day of sepsis diagnosis in 160 septic patients after abdominal and thoracic surgery, and in similar number of cases (n≈160). CRP results, pre and postoperatively were recorded, with considerations of comorbidity and surgical procedure. Results: Patients with comorbidity were more likely to have a high CRP. In 68% of patients, during the first 3 days of the postoperative period, CRP was requested. In this study, we observe a CRP peak at postoperative two or three days, and then it fell. In present study, the multivariate analysis shown, that APACHE II score, and PCT level were independent early predictive markers to indicate the severe lethal sepsis. In this study, 70% of the high-risk patients died of sepsis. The predictive power of both parameters (PCT, APACHE II score) in combination was shown to be superior to that of either single parameter. Conclusions: In multivariate analysis, both APACHE II score and PCT were identified as independent and early predictive indicators of severe sepsis, and sepsis lethality. The NICE guidelines do not recommend the usual determinations in preoperative of the CRP, and the postoperative levels of CRP have a limited role to screen the infection. The CRP level can be used in diagnosis of infection after the first three postoperative days. The routine use of CRP in preoperatively and in the first 2-3 days postoperatively is not recommended.

INTRODUCERE

Proteina C reactivă (PCR) este o proteină a fazei acute cu timp de înjumătățire de 19 ore.(1,2) Creșterea concentrației serice a PCR poate fi observată în infecție, traumă, inflamație, patologie neoplazică, infarctizare tisulară.(3)

Institutul Național pentru excelența clinică și sănătate (NICE) a publicat recent ghidul privind investigațiile preoperatorii în chirurgia electivă.(4) Aceste ghiduri nu

recomandă testarea de rutină a PCR pentru pacienții internați în vederea intervențiilor chirurgicale electivă, însă până în prezent nu s-a publicat un ghid privind testările postoperatorii. O creștere a nivelului seric al PCR poate fi observată precoce în procesul bolii, ca și a altor markeri nespecifici, nivelul acestora diminuând rapid în cursul retrocedării inflamației.(3) Astfel PCR poate fi folosit ca și test în vederea detectării precoce a răspunsului inflamator în aceste cazuri.

¹Autor corespondent: Kiss Lorant, B-dul Corneliu Coposu, Nr. 2-4, Sibiu, România, E-mail: drkisslorant@yahoo.com, Tel: +40269 215050
Articol intrat în redacție în 12.06.2014 și acceptat spre publicare în 25.08.2014
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Septembrie 2014;2(3):85-88

ASPECTE CLINICE

Sepsisul sever reprezintă cauza majoră a morbidității și mortalității postoperatorii din chirurgia abdominală.

Mai multe studii au investigat parametrii clinici și imunologici pentru stabilirea riscului apariției și evoluției letale a sepsisului.(4-8,31,35) În cazuri dificile, cu intervenții chirurgicale, parametrii prognostici pot indica prezența sepsisului în cavitatea abdominală, precum și recunoașterea preoperatorie a pacienților cu risc ridicat.

Într-o serie de 33 de pacienți prezentând sepsis de etiologie diferită, Wunder și colab. au identificat nivelul sistemic al procalcitoninei, scorul APACHE II, și au găsit o corelație între acestea și evoluția nefavorabilă. (9,34,36)

În studiul prezent am analizat două categorii din pacienții noștri, supuși intervențiilor chirurgicale toracice și abdominale. Scopul acestui studiu în primul lot de bolnavi a fost analiza și compararea datelor preoperatorii a nivelului seric al PCR cu cele din postoperator, precum și analiza literaturii existente și ghidurile.

În al doilea lot de bolnavi, PCT a fost evaluată ca predictor al recunoașterii precoce al sepsisului postoperator, împreună cu scorul APACHE II, la 80 de pacienți care au dezvoltat sepsis după intervenții viscerale majore, sepsisul fiind cauzat de peritonită sau infecții pleuro-pulmonare. Evaluarea sistematică a pacienților a identificat trei bolnavi care au prezentat cel mai ridicat grad de risc, fiind individualizați în terapie pentru a asigura cel mai bun rezultat posibil. Subgrupa identificată având risc înalt reprezintă 80% din decesele postoperatorii, însă doar 15% se datorează procedurilor chirurgicale.(10-13)

Componenta cheie a procentelor ridicate de complicații postoperatorii este neidentificarea pacienților cu risc ridicat în vederea luării măsurilor adecvate preoperator.(11) De exemplu, în Anglia, mai puțin de 30% din pacienții cu risc mare sunt admiși postoperator în terapia intensivă.(11,12)

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

În acest studiu retrospectiv au fost înrolați bolnavii internați pentru intervenții electivă în clinica Chirurgie I, în intervalul ianuarie 2008 și decembrie 2012. Datele obținute prin determinarea PCR au fost analizate de la 160 de bolnavi în preoperator, iar pacienții care au avut peste 5 zile de la internare au fost excluși din studiu. Analiza statistică a fost efectuată prin testul t, diferențele statistice semnificative fiind cele cu $p < 0.05$. Pentru folosirea PCT în identificarea sepsisului postoperator au fost analizate datele de la 80 de pacienți cu sepsis tratați în terapie intensivă, în intervalul ianuarie 2008 – decembrie 2012. În studiu au fost incluse cazurile reprezentând complicațiile postoperatorii, peritonitele secundare, perforații la organele cavitare, precum și sepsisurile primare pleurale, pulmonare. Profilul clinic al pacienților din acest studiu (sepsis) este redat în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1. Datele pacienților septici, folosind PCT

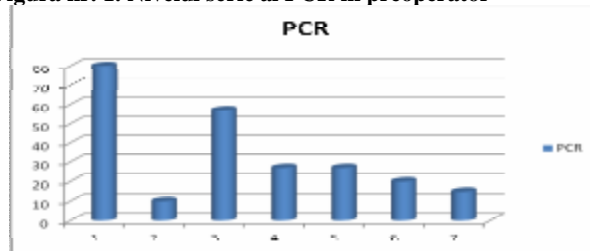
Date	Nr	
Afecțiuni maligne	50	
Afecțiuni benigne	30	
Terapie neoadjuvantă	Fără	69
	Chimioterapie	4
	Radio-chimioterapie	7
Chirurgie	Gastrectomie	8
	Rezecții colorectale	27
	Intestin subțire	8
Localizarea focarului septic	Plămân	9
	Cavitatea pleurală	8
	Esofag	1
	Colon	4
	Stomac	1

În conformitate cu criteriile existente, diagnosticul de sepsis include confirmarea existenței a cel puțin două condiții din următoarele (14): febră peste 38°C, sau temperatură sub 36°C, tahicardie peste 90 de bătăi pe minut, polipnee cu peste 20 de respirații pe minut și leucocitoză de peste 12.000/ml, sau sub 4000/ml, precum și/sau prezența formelor imature în peste 10%. La pacienții septici s-au recoltat testele biologice din sângele venos, în ziua stabilirii diagnosticului de sepsis.

REZULTATE

La 160 de pacienți supuși intervențiilor programate s-a determinat nivelul seric preoperator al PCR (figura nr. 1).

Figura nr. 1. Nivelul seric al PCR în preoperator



Tabelul nr. 1 arată că 55% din pacienții cu determinarea PCR au avut valori normale de PCR (<6 mg/l, 5% au avut PCR >30mg% și ceilalți au avut o creștere moderată a PCR-ului (40%).

Tabelul nr. 2. Rezultatul PCR la 160 de pacienți în preoperator

PCR (mg/l)	Pacienți (%)
<6	55
<10	75
<20	90
<30	96

În acest studiu, la pacienții fără comorbidități, nivelul seric al PCR a fost mai redus în raport cu bolnavii prezentând comorbidități ($p < 0.001$).

Tabelul nr. 2 arată că pacienții diabetici, canceroși, cu afecțiuni renale prezentau la internare nivelul ridicat al PCR (≥ 30 mg/l).

Tabelul nr. 3. Nivelul PCR la pacienții cu și fără morbidități

Nr. pacienți	Fără comorbiditate	Comorbiditate	Cancer	Diabet	Af. renale	Cardiace
Nr. pacienți	30	123	56	40	9	55
PCR% <6mg/l	68	50	41	42	50	26
PCR% <10mg/l	92	68	57	63	50	67
PCR% <20mg/l	100	87	84	80	61	50
PCR% <30mg/l	100	92	88	85	76	92

La 160 de pacienți, PCR a fost determinat în preoperator și în cursul primelor 3 zile postoperator, pe durata studiului efectuat. Fig. 1 arată că în postoperator 70% din pacienți au avut determinate nivelurile serice a PCR în cursul primelor 3 zile și că la majoritatea determinarea a fost pe o zi. Mai puțin de 20% din pacienți au avut determinat nivelul PCR după a 3-a zi postoperator.

Rezultatele obținute prin determinarea PCR au arătat că pentru PCR determinată în primele 3 zile postoperator, nivelul acesteia a fost maxim în a 2-a zi postoperator și nivelul scade în următoarele două zile. În al doilea studiu au fost încadrați pacienții la care s-a determinat nivelul procalcitoninei

ASPECTE CLINICE

(PCT), constatând la aceștia apariția sepsisului în a 8-a zi postoperator. Majoritatea pacienților au dezvoltat sepsis în prima zi postoperatorie după intervenții efectuate pentru perforații intestinale (14,5%).

Rata generală a mortalității în sepsis a fost de 36%. PCT și scorul APACHE II au fost singurele elemente predictive din prima zi a sepsisului în privința evoluției letale, ceilalți parametri examinați nefiind semnificativi.

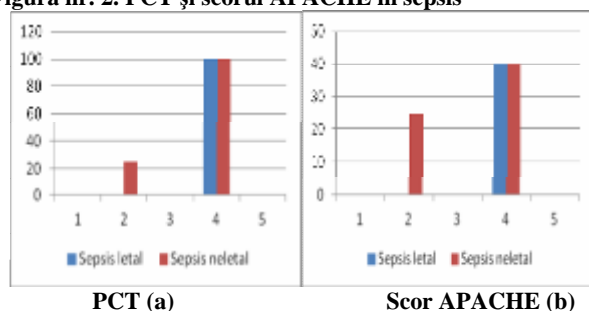
PCT prin analiză univariabilă $p < 0,01$, PCT prin analiză multivariabilă $p = 0,05$, scorul APACHE II univariabil $p < 0,001$ și multivariabil $p = 0,001$ (tabelul nr. 4).

Tabelul nr. 4. Parametrii clinici, PCT, scorul APACHE II și decesele prin modelul uni și multivariabil

	Valoarea P	
	Univariabil	Multivariabil
Vârsta	208	Nesemnificativ (NS)
Cancer	270	NS
PCT	$< 0,001$	0,005
APACHE II	$< 0,001$	0,001
Tipul operației	120	0,001
Topografia sepsei	0,2	NS

Pacienții dezvoltând sepsis soldat cu decese au prezentat în mod semnificativ nivele mai mari ale PCT în raport cu bolnavii care au supraviețuit sepsisului ($p < 0,01$), iar scorul APACHE II a fost mai mare în sepsisul ireversibil ($p < 0,001$) (figura nr. 2 a, b).

Figura nr. 2. PCT și scorul APACHE în sepsis



Folosind scorul prognostic, sepsisul letal poate fi determinat cu o sensibilitate de 70%, pe când supraviețuirea septicului a fost identificată cu o specificitate de 77% (tabelul nr. 5).

Tabelul nr. 5. Specificitatea și sensibilitatea pentru prognostic + nivelul PCT, scorul APACHE II

	Sepsis letal	Sepsis neletal	Total
Risc redus	28,5%	75%	59%
Risc crescut	71%	27,3%	40%

DISCUȚII

Studiul prezent a demonstrat că în preoperator majoritatea pacienților fără comorbiditate asociată au avut un nivel normal sau foarte puțin crescut al PCR, și că rezultate patologice ale nivelului PCR se pot observa cu mai mari șanse în prezența comorbidității. Studiile actuale NICE nu recomandă testarea de rutină a nivelului seric al PCR în preoperator la pacienții supuși intervențiilor programate.(4)

În cancerle colorectale, esofagiene, concentrația preoperatorie a PCR este un indicator prognostic (15,16,17), parțial datorită secreției de PCR de către tumoare.(18)

Unele studii arată că pacienții cu esogastrectomii prezentând în preoperator nivelul seric de PCR ridicat au șanse mai mari de a dezvolta complicații.(3)

Diagnosticul precoce al sepsisului postoperator și severitatea acestuia au fost esențiale pentru terapia de urgență. Mai multe studii din literatură au raportat evaluarea sepsisului (7, 8), scorul APACHE II fiind folosit frecvent pentru estimarea riscului în terapia intensivă.(19) Natura nespecifică a nivelului PCR decelat indică o interpretare cu prudență atunci când ea este folosită în evaluarea prognosticului și al riscului complicațiilor postoperatorii. Creșterea nivelului seric al PCR este consecința traumei chirurgicale și atinge maximul la 48 de ore postoperator.(20,21)

Unele studii au arătat un raport între creșterea nivelului postoperator al PCR și mărirea traumei operatorii (22), însă noi nu am constatat această corelare. Răspunsul modificării PCR are un caracter individual și foarte variabil, putând fi incomplet sau absent.(23,24)

În acest studiu, PCR a fost măsurată postoperator, rezultatele obținute arătând că nivelul PCR crește în perioada postoperatorie, atingând vârful în zilele 2-3, apoi diminuează. Aceste date confirmă că în majoritatea intervențiilor electiv se poate aștepta la creșterea nivelului PCR, constatări ce corespund studiilor anterioare. Pentru evaluarea riscului septic am combinat scorul APACHE II cu nivelul seric al PCT într-un model unic de prognoză, după ce am identificat că ambii sunt factori de prognostic independenți ai mortalității din sepsis. S-a observat că în prezența combinării celor doi factori, rezultatele sunt superioare celor observate prin aprecierea singulară a datelor, deasemeni am observat că decesele consecutive sepsisului pot fi prognozate cu o înaltă specificitate și sensibilitate. Nu am observat nici o corelație între nivelul PCR și incidența apariției infecțiilor în primele 3 zile, și luând în considerare și alte publicații am concluzionat că PCR nu este un bun indicator al prezenței infecției postoperatorii precoce. (26,27) Creșterea nivelului seric al PCR în zilele 2-3 postoperator după majoritatea intervențiilor majore, poate indica prezența infecției.(28,29)

Lindberg și colab. (27) au arătat prezența a doi sau mai mulți markeri în detectarea infecției după a 3-a zi postoperator.(30)

CONCLUZII

Determinarea de rutină al nivelului seric al PCR în primele 2-3 zile postoperator nu este recomandabilă. La pacienții cu risc ridicat, poate fi folosit cu scop de selectare în zilele 3-5 postoperator.

Scorul APACHE II și nivelul PCT au fost identificați ca indicatori independenți pentru evaluarea evoluției letale a sepsisului și poate fi folosit în creșterea prognosticului peritonitei postoperatorii.

REFERINȚE

- Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993;Apr;91(4):1351-7.
- Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004 Nov 19;279(47):48487-90.
- Mark B. Pepys and Gideon M, Hirschfield. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111(12):1805-1812.
- NICE: Guideline Development Group Preoperative Tests: The Use of Routine Preoperative Tests for Elective Surgery.evidence methods, and guidance London: 2003 Jun.
- Wittmann DH, Schein M, Condon RE. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg* Jul 1996;224(1):10-18.
- Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful?

- Current Opinion in Critical Care: October 2005;(11)5:473-480.
7. Emmanuel K, Weighardt H, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B. Current and future concepts of abdominal sepsis. *World J Surg* 2005 Jan;29(1):3-9.
 8. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, et al. Plasma Cytokine Measurements Augment Prognostic Scores As Indicators of Outcome in Patients With Severe Sepsis. *Shock*: June 2005;23(6):488-493.
 9. Wunder C, Eichelbröner O, Roewer N. Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. *Inflamm Res* 2004 Apr;53(4):158-63. Epub 2004 Mar 18.
 10. Weiser TS, Regenbogen SE et al. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *The Lancet* 2008;372(9633):139-144.
 11. Pearse RM, Harrison DA, et al. Identification and characterisation of the high-risk surgical population in the United Kingdom. *Critical Care* 2006;10:R81.
 12. Haynes AB, Weiser TG, Berry WR et al. A Surgical Safety Checklist to Reduce Morbidity and Mortality in a Global Population. *N Engl J Med* 2009;360:491-499.
 13. Khuri SF, Henderson WG, DePalma RG, et al. Determinants of long-term survival after major surgery and the adverse effect of postoperative complications. *Ann Surg* 2005 Sep;242(3):326-41; discussion 341-3.
 14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992 Jun;101(6):1644-55.
 15. Gockel I, Dirksen K, Messow CM, Junginger T. Significance of preoperative C-reactive protein as a parameter of the perioperative course and long-term prognosis in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus. *World J Gastroenterol* 2006 Jun 21;12(23):3746-50.
 16. Nozoe T, Matsumata T, Kitamura M, Sugimachi K. Significance of preoperative elevation in serum C-reactive protein as an indicator for prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998;176:335-338.
 17. Nielsen HJ, Christensen IJ, Sørensen S, Moesgaard F, Brünner N. Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. The RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Ann Surg Oncol* 2000 Sep;7(8):617-23.
 18. Nozoe T, Korenaga D, Futatsugi M, Saeki H, Maehara Y, Sugimachi K. Immunohistochemical expression of C-reactive protein in squamous cell carcinoma of the esophagus - significance as a tumor marker. *Cancer Lett* 2003 Mar 20;192(1):89-95.
 19. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985 Oct;13(10):818-29.
 20. Colley CM, Fleck A, Goode AW, Muller BR, Myers MA. Early time course of the acute phase protein response in man. *J Clin Pathol* 1983 Feb;36(2):203-7.
 21. Cappabianca G, Paparella D, Visicchio G et al. Preoperative C-reactive protein predicts mid-term outcome after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2006 Dec;82(6):2170-8.
 22. Brewster N, Guthrie C, McBirmie J. CRP levels as a measure of surgical trauma: a comparison of different general surgical procedures. *J R Coll Surg Edinb* 1994 Apr;39(2):86-8.
 23. Bourguignat A, Féraud G, Jenny JY, Gaudias J. Incomplete or absent acute phase response in some postoperative patients. *Clin Chim Acta* 1997 Aug 8;264(1):27-35.
 24. Steinbach G, Rau B, Debard AL et al. Multicenter evaluation of a new immunoassay for procalcitonin measurement on the Kryptor System. *Clin Chem Lab Med* 2004 Apr;42(4):440-9.
 25. Giannoudis PV, Smith MR, Evans RT et al. Serum CRP and IL-6 levels after trauma. Not predictive of septic complications in 31 patients. *Acta Orthop Scand* 1998 Apr;69(2):184-8.
 26. Khan MH, Smith PN, Rao N, Donaldson WF. Serum C-reactive protein levels correlate with clinical response in patients treated with antibiotics for wound infections after spinal surgery. *Spine J* 2006 May-Jun;6(3):311-5.
 27. Lindberg M, Hole A, Johnsen H et al. Reference intervals for procalcitonin and C-reactive protein after major abdominal surgery. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62(3):189-94.
 28. White J, Kelly M, Dunsmuir R. C-reactive protein level after total hip and total knee replacement. *J Bone Joint Surg [Br]* 1998;80-B:909-11
 29. Grande M, Tucci GF, Adorisio O. Systemic acute-phase response after laparoscopic and open cholecystectomy. *Surg Endosc* 2002 Feb;16(2):313-6. Epub 2001 Nov 12.
 30. Mentula P, Kylänpää ML, Kempainen E, Repo H, Puolakkainen P. Early inflammatory response in acute pancreatitis is little affected by body mass index. *Scand J Gastroenterol* 2007 Nov;42(11):1362-8.
 31. Zügel N, Siebeck M, Geissler B, Lichtwark-Aschoff M, Gippner-Steppert C, Witte J et al. Circulating mediators and organ function in patients undergoing planned relaparotomy vs conventional surgical therapy in severe secondary peritonitis. *Arch Surg* 2002 May;137(5):590-9.
 32. Paugam-Burtz C, Dupont H, Marmuse JP, Chosidow D, Malek L, Desmots JM, Mantz J. Daily organ-system failure for diagnosis of persistent intra-abdominal sepsis after postoperative peritonitis. *Intensive Care Med* 2002 May;28(5):594-8. Epub 2002 Mar 15.
 33. Katja B, Hartmut K, Pawel M, Stefan B, Kox WJ, Spies CD. The value of immune modulating parameters in predicting the progression from peritonitis to septic shock. *Shock* 2001;15:95-100.
 34. Mulari K, Leppäniemi A. Severe secondary peritonitis following gastrointestinal tract perforation. *Scand J Surg* 2004;93(3):204-8.
 35. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004 Jul 15;39(2):206-17. Epub 2004 Jul 2.
 36. Rau B, Krüger CM, Schilling MK. Procalcitonin: improved biochemical severity stratification and postoperative monitoring in severe abdominal inflammation and sepsis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2004;389(2):134-144.