

Valutazione della produttività del virus dell'HPV mediante analisi dell'mRNA virale: una nuova tecnica molecolare per individuare l'attività del virus

Andrea Tinelli*, Giuseppe Leo°, Maurizio Pisanò°, Fabio Storelli°, Anna Maria Nuzzo°, Simona Volpe°, Valeria Mezzolla°, Raffaella Tunno°, Maria Maddalena Galante°, Maria Rosa Montinari**

* Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Vito Fazzi, Asl Lecce

° Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS), Ospedale Vito Fazzi, Asl Lecce

°° Laboratorio di Citologia e Anatomia Comparata, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, DISTEBA, Università del Salento, Lecce

Riassunto

Introduzione: Il papillomavirus (HPV) è un virus molto studiato per la sua capacità di trasformazione neoplastica, nelle cellule che infetta, soprattutto a livello genitale femminile, per integrazione del DNA virale nel DNA cellulare; il problema clinico strettamente attuale è capire quali siano le donne infettate che presentino attività virale o meno, per poter definire l'eventuale produttività del virus e sottoporle a uno follow up clinico strumentale personalizzato.

Materiali e metodi: un gruppo di donne afferenti al Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS), dell'Ospedale "Vito Fazzi" di Lecce, per sospetta recente infezione da HPV sono state sottoposte a ricerca dell'HPV mediante l'amplificazione della regione L1 del genoma virale (Test DNA-HPV L1) con l'impiego della tecnologia REAL-TIME PCR Sybr Green. I campioni positivi per HPV ad alto rischio sono stati indagati con un nuovo test che ricerca l'mRNA dell'HPV (NucliSENS EasyQ), che consente di determinare la presenza dell'mRNA delle regioni E6 ed E7 dell'HPV: 16, 18, 31, 33 e 45. Infine, abbiamo effettuato un confronto tra i risultati ottenuti con le due tecniche

Risultati: sono stati analizzati 130 donne, rilevandone in 42 la positività al virus (32.3%) e in 19 di queste la presenza di mRNA di uno o più di uno dei cinque genotipi oncogeni di HPV (45.2). Dal

INTRODUZIONE

La presenza di un'infezione da Papillomavirus (HPV) nella maggior parte dei casi di neoplasia della cervice uterina è considerata un elemento di prova del ruolo preminente dell'attività dell'HPV nello sviluppo di questo di tumore femminile.

L'associazione fra HPV e cervicocarcinoma è incontrovertibile, coerente e specifica per un numero limitato di tipi virali, decimanti genotipi ad alto rischio, fra cui spiccano, per ora, il 16, il 18, il 31, il 33 e il 45 (1).

Il rischio di contrarre un'infezione da HPV nel corso della vita di una donna è molto elevata, giungendo sino all'80% dei casi, ma solo una piccola percentuale delle donne infettate svilupperà una neoplasia cervicale di alto grado, grazie a questa differenza di genotipi, ad alto, medio e basso rischio (2).

Lo spettro delle manifestazioni cliniche dell'HPV si estende dalle patologie benigne, quali ad esempio le verruche genitali, causate da genotipi a basso rischio (comunemente HPV 6 ed 11), fino alle neoplasie invasive, causate da genotipi di HPV ad alto rischio.

Tra quest'ultimi, i genotipi 16 e 18 sono associati ad oltre il 70% dei casi di cancro cervicale a livello mondiale (3-4).

Tra le donne infette da HPV appare, dunque, di fondamentale importanza individuare quel-

le con genotipo ad alto rischio di trasformazione neoplastica genitale, in modo da definire quali siano quelle da monitorare in maniera intensiva.

Per poter definire quali di queste siano quelle con infezione da HPV ad alto rischio, è necessario utilizzare metodi che rivelino l'infezione persistente del virus, attraverso la rilevazione dell'espressione di oncogeni virali o l'uso di marcatori umani supplementari (5). Attualmente, i metodi utilizzati per la diagnosi delle infezioni da HPV hanno come target la regione L1, una regione altamente conservata del genoma virale; tali metodi, tuttavia, permettono esclusivamente di valutare la presenza del DNA del virus, ma non forniscono informazioni riguardo l'eventuale attività del virus o produttività dell'infezione; tali informazioni sarebbero, invece, opportune e indispensabili per identificare, precocemente, quei casi che potrebbero evolvere verso la trasformazione neoplastica.

L'effetto oncogeno del virus è legato ai geni E6 ed E7 dei genotipi di HPV ad alto rischio e la loro continua espressione appare necessaria per la trasformazione ed il mantenimento del fenotipo neoplastico o displastico delle cellule cervico-vaginali.

Pertanto, la rilevazione dei prodotti di trascrizione (m-RNA) dei geni E6 ed E7 dei geno-

confronto fra il test per la ricerca di mRNA-HPV ed il Test DNA-HPV L1, è emerso che i risultati erano totalmente concordi nel 78.9% dei casi, mentre erano parzialmente o totalmente discordanti nel 21.1%, cioè nelle infezioni virali classificabili non attive.

Conclusioni: la rilevazione contemporanea nei campioni esaminati sia del DNA virale che dell'mRNA virale permette d'individuare, con assoluta precisione, la presenza di un'infezione da HPV e la sua attività; la produzione persistente delle oncoproteine E6 ed E7, rilevabile con la ricerca dell'HPV-mRNA, permette di identificare i soggetti a rischio per una probabile evoluzione dell'infezione virale verso una trasformazione cellulare neoplastica. Ciò potrebbe consentire al clinico, con un notevole margine di affidabilità, di disporre di un maggior numero d'informazioni utili per selezionarne e personalizzarne il follow up.

Parole chiave

HPV, DNA test

mRNA test

Sequenziamento molecolare

PCR

Sonde molecolari

Summary

Viral HPV activity evaluation by mRNA analysis: a new molecular technique to detect viral activity

Introduction: Human papillomavirus (HPV) are well studied virus for its transforming capability in neoplasm, in infecting cells, particularly in female genital areas, for DNA integration in cellular DNA; the current clinical problem is to target who is an infected women with viral activity or not, to define the eventual viral productivity and to submit them to a clinical and instrumental follow up

Material and methods: a group of women, referent to Biological Molecular and Experimental Oncological Lab (LBMOS) of "Vito Fazzi" Hospital of Lecce, for suspect of recent HPV infection by ORF L1 amplification test (DNA-HPV L1 Test), and by REAL-TIME PCR Sybr Green technology. The positive samples to high risk HPV were studied by a new mRNA-HPV Test (NucliSENS EasyQ), to show the presence of mRNA in E6 and E7 HPV regions of subtypes: 16, 18, 31, 33 and 45. Finally we compared the results obtained with both molecular methods.

Results: we analyzed 130 women, finding 42

tipi di HPV ad alto rischio rappresenta un utile fattore di valutazione del rischio di sviluppo di una neoplasia cervico-vaginale, rispetto alla sola rilevazione del DNA virale (6).

Da quanto emerso nella disamina della problematica inerente alla produttività o meno delle infezioni da HPV, abbiamo deciso di ricercare l'HPV in donne con sospetta infezione virale e di sottoporle all'mRNA HPV test, in caso di positività al test DNA-HPV ad alto rischio.

MATERIALI E METODI

Un gruppo di donne afferenti al Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS), dell'Ospedale "Vito Fazzi" di Lecce, per sospetta infezione da HPV, sono state sottoposte, mediante analisi del muco cervico-vaginale raccolto con scrape cervicale, a ricerca dell'HPV, durante il periodo compreso fra il primo gennaio 2007 e il maggio 2008

I campioni di muco cervico-vaginale sono stati analizzati mediante l'amplificazione della regione L1 del genoma virale (Test DNA-HPV L1), una regione altamente conservata, presente in tutti i genotipi di HPV, che codifica per la proteina capsidica maggiore del virus.

L'amplificazione è stata ottenuta attraverso l'impiego della tecnologia REAL-TIME PCR, utilizzando la molecola fluorescente SYBR Green ed i primer MY09 e MY11 diretti verso una regione di 450 bp all'interno dell'ORF L1. L'analisi del segnale fluorescente emesso, che risulta essere direttamente proporzionale all'amplificazione della regione virale L1, ha permesso di rilevare la presenza di un'infezione da Papillomavirus.

Inoltre, attraverso l'analisi della Temperatura di melting (Tm), è stato possibile operare una classificazione indicativa tra genotipi di HPV ad alto e a basso rischio.

La Temperatura di melting (temperatura alla quale il 50% del DNA di un organismo risulta denaturato) dipende, infatti, dalla percentuale delle basi Guanina e Citosina presenti nel filamento target ed i diversi genotipi di HPV differiscono tra di loro proprio per quanto riguarda la composizione in basi dello specifico filamento di DNA.

Successivamente si è proceduto, per le pazienti risultate positive all'HPV, con l'identi-

ficazione del genotipo di HPV responsabile dell'infezione, mediante l'utilizzo di una tecnica che sfrutta il principio dell'ibridazione dei prodotti di amplificazione con 37 sonde oligonucleotidiche, specifiche per altrettanti genotipi di HPV.

Dai dati ottenuti sull'analisi della presenza dei genotipi di HPV ad alto rischio, in particolare il 16, il 18, il 31, il 33 e il 45, abbiamo ricercato la produttività dell'infezione virale attraverso l'impiego di un nuovo test di ricerca, l'mRNA HPV.

Questo test per la ricerca denominato mRNA HPV E6/E7 test, è in commercio con il nome di NucliSENS EasyQ® e si basa sulla tecnologia NASBA e consente di determinare l'attività oncogena di quei 5 genotipi di HPV ad alto rischio, rilevando la presenza dell'mRNA delle regioni E6 ed E7 che, come suddetto, svolgono un ruolo chiave nel processo di trasformazione neoplastica;

Infine, abbiamo effettuato un confronto tra i risultati ottenuti attraverso la tecnica di ibridazione molecolare e quelli ottenuti con la nuova metodica di rilevazione dell'mRNA delle regioni E6 ed E7 del virus.

RISULTATI

Sono stati analizzati complessivamente 130 campioni di pazienti, rilevandone in 42 la positività al virus (32.3%).

Tra i 42 campioni risultati positivi al Papillomavirus, 19 (45.2 %) presentavano uno o più di uno dei cinque genotipi oncogeni di HPV (16, 18, 31, 33 e 45) che, come emerge in letteratura (1), sono presenti nell'82.9 % dei casi di carcinoma della cervice uterina; su tali campioni di muco cervico-vaginale è stata poi valutata l'espressione delle oncoproteine virali E6 ed E7.

I casi positivi a quest'ultimo test hanno permesso d'individuare le infezioni virali produttive e quindi i virus non quiescenti, in grado di produrre le oncoproteine trasformanti E6 ed E7.

Inoltre, dalla comparazione del test NucliSENS EasyQ® per la ricerca di mRNA-HPV e del Test DNA-HPV L1 sono emersi dei dati alquanto sostanziali, in quanto quest'ultimo test ha rilevato la presenza di un numero di genotipi maggiore rispetto a quelli evidenziati dal test mRNA

Difatti, il Test DNA-HPV L1 si avvale dell'u-

HPV positivity (32.3%) and in 19 of these we checked the high risk HPVs mRNA presence of one or more of them (42.5). Comparing the two tests, the NucliSENS EasyQ for the mRNA-HPV research and the DNA-HPV L1 Test, we detected a total concordance in 78.9% of cases, while in 21.1% they were totally or partially discordant, defining, so, the viral infections as non actives.

Conclusion: the contemporary detection, in the examined samples, either of viral DNA or of viral mRNA permits to establish, with absolute precision, the presence of a HPV infection and its activity; the persistent production of E6 and E7 onco-proteins, finding by HPV-mRNA research, allows to identify the patients at risk for a probable evolution of viral infection to a neoplastic cellular transforming. It could permit to a clinicians, with a large entrusting margin, to have an extensive panel of useful information to select and personalize the follow up.

Key words

HPV
DNA test
mRNA test
Molecular sequencing
PCR
Molecular probe

utilizzo di sonde specifiche per 37 diversi genotipi del virus, mentre il NucliSENS EasyQ utilizza delle sonde dirette verso l'mRNA delle regioni E6 ed E7 di soli 5 genotipi di HPV ad alto rischio.

Prendendo in considerazione soltanto tali 5 genotipi per 15 campioni sui 19 esaminati (78.9%), i risultati ottenuti con la metodica NASBA hanno confermato i risultati ottenuti con il test del DNA.

In 2 casi su 19 è stata riscontrata una parziale concordanza: nel primo soggetto in studio, il test per la rilevazione dell'mRNA-HPV ha rivelato la presenza del trascritto delle regioni E6 ed E7 per i genotipi 18 e 45, ma non per il genotipo 16; nella seconda paziente, il test mRNA-HPV ha rivelato la presenza dei trascritti delle regioni E6 ed E7 per il genotipo 18, ma non per il genotipo 16.

Infine, in altri 2 casi su 19 è stata riscontrata una totale discordanza di risultati: il test del DNA ha accertato, rispettivamente, la positività ai genotipi 31 e 16, risultato che non è stato confermato dalla metodica mRNA-NASBA. In totale, quindi, il 21.1% circa dei casi esaminati presentava infezioni classificabili come infezioni non produttive parziali o totali. I dati suddetti sono esposti nella Tabella 1.

DISCUSSIONE

La ricerca della presenza di HPV in donne in età fertile è sempre più richiesta nei laboratori biologici e microbiologici.

Da quanto emerge dai dati correnti sulle malattie sessualmente trasmesse, l'infezione da HPV rappresenta l'infezione virale più comunemente trasmessa per via sessuale; attualmente sono noti circa 200 genotipi del virus di cui più di 30 sono in grado di infettare il tratto genitale (1).

Nonostante il Pap-test sia uno dei test di screening più diffusi e a basso costo, la sua importanza come strumento di predittività, nei confronti della presenza dell'infezione da HPV, tende a ridursi, pur rimanendo fondamentale nel monitoraggio del grado della lesione cellulare e, quindi, dell'evoluzione della patologia precancerosa.

Negli ultimi anni i test di biologia molecolare sono entrati a far parte della diagnosi di routine delle infezioni da Papillomavirus.

Test quali la REAL-TIME PCR, l'ibridazione molecolare ed il sequenziamento del DNA

consentono la massima sensibilità e specificità ed una rapida ed accurata identificazione dei genotipi di HPV responsabili dell'infezione virale, grazie all'individuazione dell'ORF L1 del genoma del virus (1).

L'alta prevalenza di soggetti positivi al test DNA-HPV, però, non corrisponde alla bassa incidenza neoplastica genitale; si è difatti visto che non è l'intero virus ad avere un ruolo attivo nel processo di carcinogenesi, ma la trasformazione neoplastica è legata alla produzione delle oncoproteine virali E6 ed E7. Inoltre, il test DNA-HPV potrebbe fornire, in alcuni casi, falsi negativi.

L'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite implica, spesso, la perdita di parte del genoma dell'HPV: di conseguenza, sarebbe impossibile individuare la presenza del virus, se il gene L1 fosse deletato anche parzialmente.

I test basati sulla rilevazione del DNA del virus non sono i più adeguati per prevedere l'insorgenza di un cervico-carcinoma, poiché essi rilevano esclusivamente la presenza del DNA virale, ma non l'attività oncogenica (7,8). Proprio per questa ragione sono stati recentemente introdotti sul mercato dei test per la rilevazione dell'mRNA delle regioni E6 ed E7 di alcuni genotipi oncogeni di HPV (7,8).

Il test mRNA-HPV è molto sensibile ed è quindi in grado di rilevare le infezioni allo stadio iniziale, molto prima che le modificazioni cellulari siano visibili in un normale campione di cellule studiato al microscopio (9,10).

In questa ricerca lavoro la positività all'infezione virale è stata rilevata utilizzando una tecnica di amplificazione genica del DNA di comune impiego nella diagnosi di laboratorio, ossia la REAL-TIME PCR (11).

Tutti i campioni risultati positivi sono stati sottoposti a genotipizzazione attraverso ibridazione con sonde specifiche.

L'attenzione è stata quindi focalizzata su quei campioni risultati positivi ai 5 genotipi ad alto rischio, verso cui è rivolto il test mRNA-HPV; l'impiego di tale test ha consentito di individuare quali, tra le infezioni risultate positive al test DNA, fossero infezioni virali attive (12).

Dai risultati dal nostro studio possiamo affermare che sicuramente il test per la rilevazione dell'RNA messaggero (m-RNA) rappresenta un'importante innovazione nell'ambito del-

la prevenzione del carcinoma della cervice, dal momento che esso consente di accertare la presenza di un fattore di rischio di trasformazione neoplastica, in uno stadio molto precoce, quando non sono ancora evidenti lesioni citologiche.

Dato che la maggior parte delle infezioni da HPV è transitoria, è, quindi, importante determinare la persistenza di una infezione da HPV, che esprime proteine trasformanti, quali le E6 ed E7 (13).

I test per la determinazione della presenza del DNA virale e quello per la determinazione della presenza dei trascritti delle regioni E6/E7 dovrebbero essere condotti contemporaneamente, soprattutto in presenza di lesioni citologiche sospette per possibile trasformazione neoplastica.

Inoltre, questo tipo di test è attualmente rivolto verso 5 genotipi oncogeni di HPV, ma il suo utilizzo non può essere applicato ad altri genotipi di HPV ad alto rischio (14).

Al contrario, i test per la rilevazione del DNA dell'HPV permettono la rivelazione della presenza di un'infezione virale, ma non forniscono informazioni circa l'espressione delle oncoproteine virali e quindi la persistenza dell'infezione virale e la sua evoluzione verso un cancro cervicale (11).

La rilevazione contemporanea nei campioni

esaminati sia del DNA virale (attraverso REAL-TIME PCR e successiva ibridazione molecolare) che dell'mRNA del virus, di uno o più dei 5 genotipi oncogeni di HPV, permette dunque d'individuare, con assoluta precisione, la presenza di un'infezione attiva da HPV. Difatti, la produzione persistente delle oncoproteine E6 ed E7, rilevabile con la ricerca dell'HPV-mRNA, permette di identificare i soggetti a rischio per una probabile evoluzione dell'infezione virale verso una trasformazione neoplastica.

Per ciò che riguarda i casi discordanti, per cui è stata evidenziata la presenza del solo DNA virale di un genotipo oncogeno, possiamo affermare che si tratta, probabilmente, di un'infezione virale attualmente non produttiva.

In caso d'infezioni non produttive non occorre dunque eseguire controlli assidui e periodici, in quanto il rischio di trasformazione neoplastica imminente non sussiste.

CONCLUSIONI

La produttività del virus nell'organismo umano è identificabile mediante la recente introduzione sul mercato di un test per la ricerca dell'mRNA delle regioni E6/E7 dei 5 principali tipi oncogeni dell'HPV ad alto rischio, marcatori di un'infezione virale attiva.

La metodica NASBA permettendo l'identifica-

zione del reale genotipo responsabile dell'infezione, oltre che la ricerca dell'HPV-mRNA delle regioni E6 ed E7, evidenzia il ruolo di importante innovazione di tale test sia nell'ambito della diagnosi di laboratorio che del monitoraggio della progressione dell'infezione virale.

In futuro, ulteriori passi in avanti nella diagnosi delle infezioni da Papillomavirus si potranno avere con l'ampliamento della gamma di ceppi di HPV verso i quali cercare eventuali marcatori di replicazione attiva (mRNA).

Ciò potrebbe consentire al clinico, con un discreto margine di affidabilità, di disporre di un maggior numero d'informazioni utili da un punto di vista diagnostico e prognostico e fruibili per terapie sempre più mirate e personalizzate.

Sebbene la vaccinazione contro l'HPV rappresenti un importante mezzo di prevenzione, occorre tener presente che essa è limitata ad un numero ristretto di tipi virali; per tale ragione, è di fondamentale importanza non affidarsi esclusivamente sulla prevenzione primaria, ma è necessario che questa sia sempre affiancata da una prevenzione di tipo secondario, ossia da efficaci test di screening, quali il Pap-test ed i test di biologia molecolare.

TABELLA 1. Comparazione dell'analisi dei 19 su 45 casi positivi all'HPV ad alto rischio, con l'impiego del test per la ricerca dell'mRNA HPV E6/E7 (NucliSENS EasyQ®) e il test DNA HPV L1

Genotipi rilevati attraverso amplificazione (PCR) e ibridazione del gene L1	Genotipi rilevati attraverso amplificazione (NASBA) e ibridazione dell'mRNA dei geni E6/E7
31, 53, 59, 66	31
6, 11, 16, 18, 45, 56	18, 45
16	16
31	31
16, 18, 59	16, 18
16, 59	16
33, 42, 54, 52/33/35/58	33
31, 52/33/35/58	31
16, 58, 52/33/35/58	16
16, 18, 31	16, 18, 31
16	16
16, 18, 53, 54, 56, 62	18
31, 62, 84	---
6, 16	16
16	16
16	16
18, 51, 53	18
31	31
16	---

BIBLIOGRAFIA

1. Tinelli A, Vergara D, Leo G, Malvasi A, Casciaro S, Leo E, Montanari MR, Maffia M, Marsigliante S, Lorusso V. Human papillomavirus genital infection in modern gynaecology: genetic and genomic aspects. *Eur Clinics Obstet Gynaecol* 2007; 3:1-6
2. Munoz N, Bosch FX, de Sanjosè S, Herrero R, Castellsaguè X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27
3. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003 Jan;16(1):1-17
4. Giles M, Garland S. A study of women's knowledge regarding human papillomavirus infection, cervical cancer and human papillomavirus vaccines. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006 Aug;46(4):311-5
5. Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsten F, Kristensen GB, Skomedal H. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 2006 Apr;44(4):1310-7
6. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrøm T, Karlsten F. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* 2007 Jun;142(1-2):204-12
7. Leo G, Pisanò M, Ciannamè B, Pitotti E, Castellano S, Vergara D, Megha M, Moschettini G, Mighali P. Role of DNA Sequencing in the Human Papillomavirus Typing. Diagnostic and Prognostic Perspectives. XXXIV Congresso Nazionale AMCLI, Roma, 2005
8. Leo G, Pisanò M, Pitotti E, Ciannamè B, Megha M, Spedicato S, Storelli F, Vergara D, Moschettini G and Tinelli A. La Tm-Real Time Sybr Green PCR per la discriminazione rapida dei genotipi HPV a basso rischio. XXXV Congresso Nazionale AMCLI, Torino, 2006
9. Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence - implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 2004;73:65-70
10. Molden T, Kraus I, Karlsten F, Skomedal H and Hagmar B. HPV E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol* 2006; 100:95-100
11. Draganov P, Todorov S, Todorov I, Karchev T, Kalvatchev Z. Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using Sybr Green real-time PCR. *Int J Ped Otorhin* 2006; 70: 469-73
12. Scheurer M.E, Dillon LM, Chen Z, Follen M, Adler-Storthz K. Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. *Inf Agent Cancer* 2007
13. Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 405-15
14. Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, Onsrud M and Thoresen S. DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 908-15