

## Diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus de la hepatitis C

J.I. Esteban Mur<sup>a</sup> y S. Sauleda Oliveras<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Medicina Interna/Hepatología. <sup>b</sup>Banc de Sang i de Teixits. Institut Català de la Salut. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. España.

### INTRODUCCIÓN

El empleo de marcadores virales es esencial tanto para el diagnóstico como para la indicación y monitorización del tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). Los marcadores con mayor utilidad clínica son: 1) los anticuerpos anti-VHC, indicadores de infección presente o resuelta; 2) el ARN del VHC, marcador directo de replicación viral, y 3) el genotipo de VHC, característica molecular propia del virus circulante. El antígeno del *core* del VHC circulante también puede emplearse como marcador de replicación viral activa. La determinación de anti-VHC se emplea para el diagnóstico de exposición al virus, mientras que la detección de ARN viral mediante técnicas moleculares, o de antígeno *core* se emplean para confirmar infección activa. La determinación del genotipo y de un marcador de replicación viral son imprescindibles para la indicación del tratamiento antiviral y para la monitorización de la respuesta al mismo.

### CINÉTICA DE LOS MARCADORES VIRALES DEL VHC TRAS LA PRIMOINFECCIÓN

La figura 1 muestra la secuencia temporal de aparición de los anti-VHC, y marcadores de replicación en relación con la alteración enzimática durante la infección aguda con resolución espontánea o evolución a la cronicidad. Los anti-VHC suelen ser detectables entre las 6 y 12 semanas, generalmente coincidiendo con la elevación de enzimas en más del 80% de casos. La presencia de ARN viral circulante puede detectarse dentro de las primeras dos semanas tras la exposición y su nivel aumenta hasta alcanzar un máximo antes de la aparición de los signos biológicos de hepatitis aguda. Luego desaparece rápidamente en los casos que resuelven la infección espontáneamente

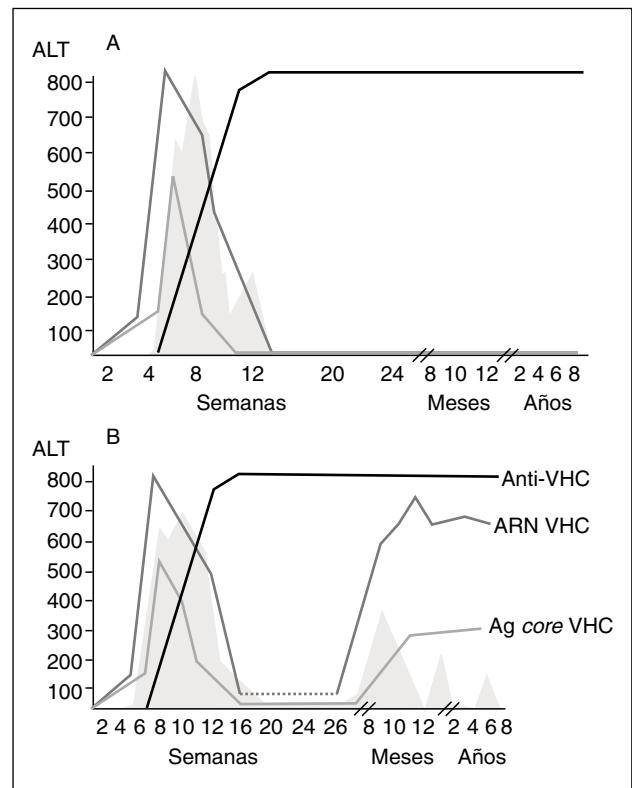


Fig. 1. Secuencia temporal de anticuerpos anti-VHC, ARN VHC y antígeno del core del VHC durante la infección aguda con resolución espontánea (A) y en la infección aguda con evolución a la cronicidad (B). El sombreado azul corresponde a los niveles de alanin aminotransferasa (ALT).

(15-40% de casos) o desciende hasta estabilizarse en los que desarrollan infección persistente. No es infrecuente que durante la fase aguda de la hepatitis el ARN sea indetectable durante semanas para reaparecer posteriormente y establecer infección persistente. Durante la infección crónica los niveles de ARN son muy estables y no guardan relación con la gravedad de la lesión hepática<sup>1,2</sup>. La presencia de antígeno del *core* (cápside) del VHC en sangre,

Correspondencia: Dr. J.I. Esteban Mur.  
Servicio de Medicina Interna/Hepatología.  
Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.  
P.º Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. España.  
Correo electrónico: jiesteban@vhebron.net

marcador fiable (aunque mucho menos sensible) de replicación viral, aparece 1-2 días después que el ARN tras la infección y sus variaciones suelen ser paralelas a las del ARN a lo largo de la infección aguda y crónica<sup>1,2</sup>.

## MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MARCADORES VIRALES

### Detección de anticuerpos anti-VHC

La detección de anti-VHC en suero o plasma se realiza mediante técnicas de EIA de tercera generación basados en la captura de anticuerpos contra epítomos presentes en proteínas recombinantes (core, NS3, NS4 y NS5) fijadas a pocillos de microplacas o microesferas adaptadas a sistemas automáticos cerrados<sup>1-3</sup>. La presencia de anticuerpos capturados se identifica mediante anticuerpos anti-anticuerpo humano marcados con enzimas que catalizan la transformación de un sustrato a un compuesto coloreado, cuya densidad óptica es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra. En sujetos inmunocompetentes con hepatitis crónica la sensibilidad y especificidad de estas técnicas es > 99%. En pacientes inmunodeprimidos (hipogammaglobulinemia, infección VIH, tratamiento inmunosupresor), su sensibilidad es inferior, por lo que un resultado negativo no descarta exposición o infección por el virus. En población general y donantes de sangre, la especificidad es inferior, por lo que en los bancos de sangre se emplean técnicas de inmunoblot recombinante para la confirmación de los resultados de los EIA<sup>1-3</sup>.

### Determinación del genotipo de VHC

El método de referencia para el genotipado del VHC es la secuenciación directa de las regiones NS5B, E1 o E2 del genoma viral circulante tras su amplificación por PCR, seguido de su alineamiento y análisis filogenético con secuencias prototipo, aunque estas técnicas se usan sólo en estudios de epidemiología molecular. En la práctica clínica el genotipo puede determinarse mediante métodos comerciales basados en secuenciación de la región 5' no codificante (Trugene 5'NC HCV Genotyping Kit; Bayer Health Care Diagnostic Division, Tarrytown, NY) o en hibridación inversa del producto amplificado con sondas genotipo-específicas de la misma región fijadas a un soporte de nitrocelulosa (INNO-LiPA HCV II; Innogenetics, Ghent, Bélgica; o Versant HCV Genotyping Assay; Bayer Health Care). Ambos métodos detectan correctamente los 6 genotipos principales, aunque no logran identificar el subtipo en 10-25% de casos, lo que carece de relevancia práctica en la decisión terapéutica. El genotipo también puede identificarse mediante EIA competitivo basado en la detección de anticuerpos genotipo-específicos frente a epítomos de la región NS4 o core. El ensayo disponible (Murex HCV Serotyping 1-6 HC02; Abbott Laboratorios, North Chicago, Ill) permite identificar el genotipo en el 90% de pacientes inmunocompetentes,

aunque no es infrecuente la reactividad mixta frente a más de un serotipo y la técnica no permite identificar el genotipo real del virus circulante<sup>1-3</sup>.

### Detección de ARN VHC circulante

Dado el bajo nivel de virus circulante, la detección del ARN o su señal requiere el uso de técnicas moleculares para su amplificación<sup>1-3</sup>. Las técnicas de amplificación de diana consisten en la síntesis de numerosas copias (amplificones) del genoma viral mediante una reacción enzimática cíclica. Ésta puede ser de dos tipos: la «reacción en cadena de polimerasa» (PCR) en la que, tras la retrotranscripción del ARN en ADN, los amplicones generados son ADN de doble cadena y la «amplificación isotérmica mediada por transcripción» (TMA) en la que las copias del genoma son moléculas de ARN de cadena simple. En ambos casos, la identificación del producto amplificado se basa en su hibridación a oligonucleótidos sintéticos fijados a una fase sólida, seguida de la detección de los híbridos mediante una reacción enzimática sobre un sustrato colorimétrico o luminiscente. Las técnicas de amplificación de señal se basan en la hibridación del ARN viral sobre oligonucleótidos de captura fijados a una fase sólida, seguida de la fijación de sondas de «ADN ramificado» (bDNA) que, a su vez, capturan múltiples oligonucleótidos marcados con un enzima que actúa sobre un sustrato luminiscente. Al igual que con las técnicas de PCR, la cuantificación se realiza por comparación con una curva estándar generada simultáneamente.

La determinación de ARN viral circulante puede ser cualitativa (presente o ausente) o cuantitativa (número de copias virales expresado en unidades internacionales). La detección cualitativa del ARN viral suele ser más sensible que muchas técnicas cuantitativas. Existen dos técnicas comerciales para la detección cualitativa del ARN viral, basadas en PCR y TMA<sup>1-6</sup>. La especificidad de ambas es cercana al 99% y sus respectivos límites de detección se detallan en la tabla 1.

La mayoría de técnicas cuantitativas se basan en la coamplificación por PCR «competitiva» del ARN viral con cantidades conocidas de un estándar sintético en el mismo tubo. Las cantidades relativas de amplicones de ARN viral y estándar sintético son cuantificadas al final de la reacción y los resultados extrapolados a partir de una curva estándar generada en paralelo. Más recientemente, se han desarrollado técnicas de PCR «en tiempo real» basadas en la detección de los amplicones al inicio de la fase exponencial de la reacción de PCR, en lugar de al final de la misma. Para ello, emplean sondas marcadas con fluorocromos cuya emisión, liberada al degradarse la sonda por acción de la ADN polimerasa, puede detectarse al inicio de la fase exponencial. Estas técnicas son mucho más sensibles, tienen menor riesgo de contaminación por arrastre y, sobre todo, un rango dinámico de cuantificación (rango de niveles de ARN en el que la cuantificación es fiable) mucho más amplio, lo que las hace especialmente útiles para la monitorización del tratamiento anti-

TABLA 1. Técnicas estandarizadas para detección cualitativa y cuantificación de ARN de VHC en suero

Técnica	Metodología	Límite detección UI/ml	Rango dinámico (log <sub>10</sub> UI/ml)
Cobas Amplicor HCV v. 2.0 <sup>a</sup>	RT-PCR cualitativa semiautomatizada	50	NA
Versant HCV RNA qualitative Assay <sup>b</sup>	TMA cualitativa	10	NA
Cobas Amplicor HCV Monitor v. 2.0 <sup>a*</sup>	RT-PCR competitiva semiautomatizada	600	2,8-5,7
Versant HCV RNA 3.0 bDNA Assay <sup>b</sup>	Amplificación de señal por «ADN ramificado»	615	2,8-6,9
LCx HCV RNA Quantitative Assay <sup>c</sup>	RT-PCR competitiva semiautomatizada	25	1,4-6,4
Cobas TaqMan HCV <sup>a</sup>	RT-PCR en tiempo real semiautomatizada	10-25	1,6-7,9

<sup>a</sup>Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ; <sup>b</sup>Bayer Healthcare LLC, Tarrytown, NJ; <sup>c</sup>Abbott Diagnostic, Chicago, IL.

Semiautomatizada: la reacción de amplificación, detección y cálculo de la cantidad de ARN en la muestra analizada se realizan automáticamente en una plataforma específica. Para estas técnicas están disponibles plataformas adicionales que automatizan también el proceso de extracción de ARN de la muestra.

ral. Además de las técnicas de amplificación de diana, las de amplificación de señal también se emplean para cuantificar el nivel de carga viral.

Las diferentes técnicas comercialmente disponibles para la cuantificación de ARN VHC se indican en la tabla 1. En la actualidad los resultados de todos los métodos se expresan en Unidades Internacionales por mililitro, de acuerdo con un patrón estándar establecido por la OMS. Los límites inferiores de detección de las diversas técnicas oscilan entre 20 y 615 UI/ml mientras que el límite superior varía entre  $< 5 \times 10^5$  y  $8 \times 10^7$  UI/ml (fig. 2). Se consideran sensibles aquellas capaces de detectar  $\leq 50$  UI/ml. Cuando el nivel de ARN en la muestra supera el límite superior del rango dinámico, ésta debe retestarse diluida al 1:10 o 1:100 para su precisa cuantificación. La especificidad de las técnicas es del 98-99% y es generalmente independiente del genotipo<sup>1-3,7</sup>. Con cualquiera de ellas, sin embargo, variaciones inferiores a 0,5 logaritmos no deben tenerse en cuenta ya que pueden corresponder a la variabilidad intrínseca del método.

La cuantificación de ARN puede hacerse tanto en suero como en plasma, siempre que éste no contenga heparina. Una vez obtenida, la muestra de sangre debe centrifugarse y el suero o plasma separado del coágulo o hematíes en un plazo  $< 3$  horas y guardarse congelado a  $-20$  °C ( $-80$  °C para almacenamiento prolongado). Las muestras no deben

someterse a nuevos ciclos de congelación y descongelación. La estricta observancia de estas normas es imprescindible para la correcta interpretación de los resultados<sup>8</sup>.

### Detección de antígeno *core* del VHC

La determinación del antígeno *core* requiere la disgregación de los inmunocomplejos circulantes y su captura y detección por EIA comercial (Track-C, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ). El nivel de antígeno (picogramos/ml) se correlaciona bien con el de ARN circulante, estimándose que 1 pg de antígeno equivale a un promedio de 8.000 UI de ARN, aunque esta relación es muy variable entre pacientes. La técnica es incapaz de detectar antígeno en muestras con nivel de ARN  $< 20.000$  UI/ml, lo que limita su utilidad<sup>1-4</sup>. Su principal ventaja es su simplicidad por lo que puede ser útil donde no se disponga de recursos e infraestructura adecuadas para determinar ARN.

### USO PRÁCTICO DE LOS MARCADORES DE REPLICACIÓN DEL VHC

Las aplicaciones prácticas de la determinación de marcadores virales del VHC se resumen en la tabla 2. Éstas

Fig. 2. Comparación de los rangos de cuantificación lineal (rangos dinámicos) de distintas técnicas cuantitativas comerciales en relación con los niveles de ARN viral circulante en la mayoría de pacientes con hepatitis crónica C. Aproximadamente el 95% de pacientes no tratados tienen cargas de ARN de VHC dentro del intervalo sombreado en azul.

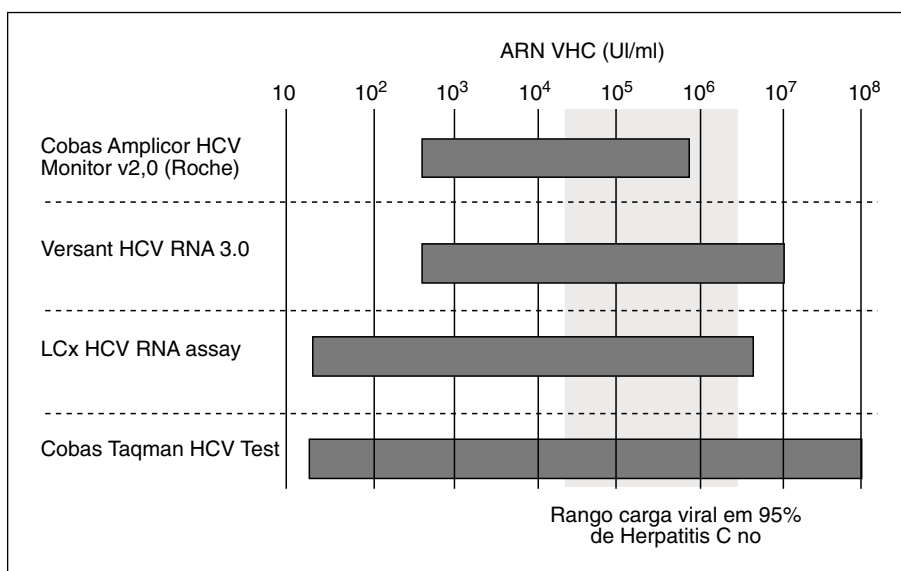


TABLA 2. Indicaciones de la determinación de marcadores de replicación del VHC en la práctica clínica

Indicación	Objetivo	Método recomendado
Diagnóstico de infección activa Cribado de donantes de sangre	Identificación donantes en período de ventana	Anti-VHC ARN cualitativo Antígeno <i>core</i>
Hepatitis aguda	Diagnóstico precoz Diagnóstico diferencial	Anti-VHC ARN cualitativo Antígeno <i>core</i>
Hepatitis crónica	Indicación de tratamiento Diagnóstico diferencial	Anti-VHC ARN cuantitativo
Recién nacidos madre portadora	Diagnóstico transmisión materno-filial	Anti-VHC 18 meses ARN cualitativo
Elevación ALT en inmunodeprimidos Exposición accidental a sangre contaminada	Diagnóstico infección anti-VHC negativa Diagnóstico precoz	ARN cualitativo o cuantitativo ARN cualitativo o cuantitativo sensible <sup>a</sup>
Tratamiento antiviral		
Evaluación pretratamiento	Confirmación replicación Carga basal de referencia	ARN cuantitativo Antígeno <i>core</i> <sup>b</sup>
Evaluación respuesta precoz a las 4 semanas	Acortar duración de tratamiento a 12-16 semanas genotipos 2/3	ARN cuantitativo Antígeno <i>core</i> <sup>b</sup>
Evaluación respuesta virológica a las 12 semanas	Interrupción precoz de tratamiento innecesario en ausencia de respuesta	ARN cuantitativo Antígeno <i>core</i> <sup>b</sup>
Evaluación respuesta fin de tratamiento (24-48 semanas)	Diagnóstico precoz de la recidiva	ARN cualitativo o cuantitativo sensible <sup>a</sup>
Evaluación respuesta fin de seguimiento (36-48-72 semanas)	Confirmación respuesta viral sostenida	ARN cualitativo o cuantitativo sensible <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Técnicas cuantitativas «sensibles» son aquellas cuyo límite inferior de detección es  $\leq 50$  UI/ml; <sup>b</sup>la cuantificación de antígeno *core* mediante EIA puede usarse para la estimación de la respuesta a las 12 semanas siempre y cuando el nivel de antígeno basal sea  $\geq 200$  pg/ml.

pueden resumirse en dos: el diagnóstico de infección aguda y crónica y la indicación de tratamiento antiviral y monitorización de la respuesta al mismo.

### Diagnóstico de hepatitis aguda

En todo paciente con hepatitis aguda deben determinarse anti-VHC y ARN viral mediante una técnica sensible. Dado que en la infección aguda la aparición de anti-VHC (seroconversión) detectables por EIA de tercera generación ocurre entre 6 y 12 semanas después de la exposición (período de ventana), la determinación de ARN o de antígeno *core* permite identificar infección por VHC, durante el período de ventana, antes de la aparición de anticuerpos, lo que es especialmente útil en el cribado de donantes de sangre, en pacientes con hepatitis aguda seronegativa, o tras exposición accidental percutánea a sangre contaminada. La posterior seroconversión a anti-VHC suele confirmar el diagnóstico a las pocas semanas. La presencia simultánea de anti-VHC y ARN no permite distinguir infección aguda de otra causa de hepatitis en un portador crónico. La presencia de anti-VHC en ausencia repetida de ARN viral suele observarse en pacientes que sufrieron exposición al VHC y resolvieron espontáneamente la infección o pueden corresponder a falsos positivos. Por otra parte, en el seguimiento de una hepatitis aguda C, la normalización del nivel de transaminasas a menudo se acompaña de la desaparición transitoria del ARN viral durante varias semanas, la resolución espontánea de la infección requiere demostrar la ausencia de ARN en una nueva muestra obtenida entre 3 y 6 meses después. Los marcadores de replicación también permiten el diagnóstico de hepatitis C en pacientes hemodializados o in-

munodeprimidos que pueden no ser capaces de desarrollar anticuerpos específicos, cuando una alteración de pruebas hepáticas sugiere la presencia de hepatitis aguda. En los neonatos de madre con infección activa por el VHC, debido a la transferencia pasiva de anti-VHC maternos, la transmisión de la infección sólo puede confirmarse durante los primeros 12 meses de vida mediante detección de ARN circulante. La persistencia de anti-VHC más allá de los 18 meses de vida confirma que se ha producido transmisión, cuya resolución o persistencia requiere la determinación de ARN.

### Diagnóstico de hepatitis crónica

En pacientes con evidencia de hepatitis crónica, la presencia de anti-VHC y ARN viral son suficientes para confirmar el diagnóstico. Por otra parte los test virológicos carecen de utilidad para establecer el pronóstico de la hepatopatía. La determinación cuantitativa del ARN viral sólo debe hacerse antes de indicar tratamiento antiviral<sup>1-3</sup>.

### Monitorización de la respuesta al tratamiento antiviral de la hepatitis crónica C

Actualmente, el tratamiento estándar de la hepatitis crónica C se basa en la combinación de interferón pegilado y ribavirina durante 24 o 48 semanas<sup>9</sup>. Tanto la probabilidad de respuesta mantenida como la duración del tratamiento están en función del genotipo y, en menor medida, de la carga viral basal, por lo que ambas deben determinarse antes de iniciarlo<sup>9-12</sup>. El objetivo del tratamiento es la erradicación viral o respuesta viral sostenida (RVS) de-

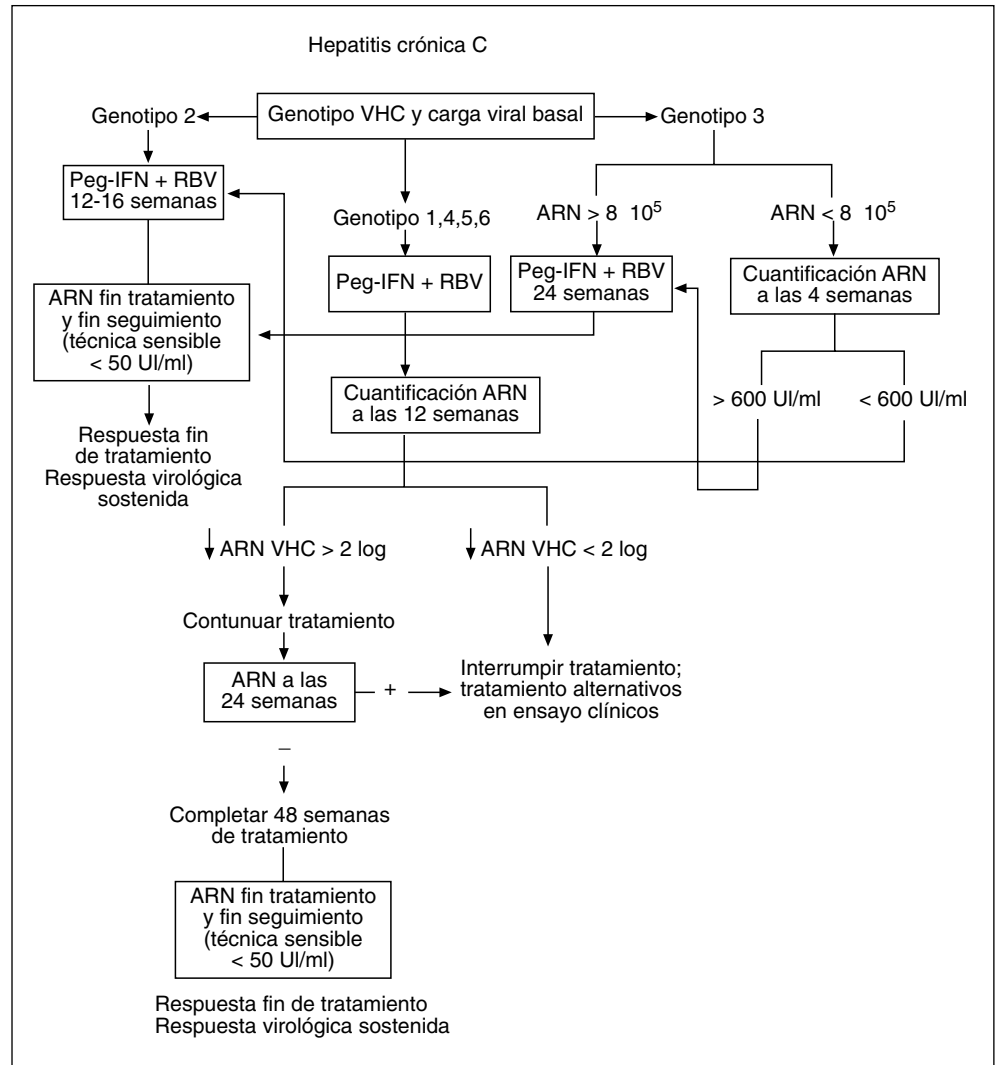


Fig. 3. Algoritmo para la individualización del tratamiento antiviral combinado con interferón pegilado (Peg-IFN) y ribavirina (RBV) y la monitorización de la respuesta en la hepatitis crónica C en función del genotipo, carga viral basal y respuesta virológica a las 4 y 12 semanas, de acuerdo con las recomendaciones de Conferencias de consenso (genotipo 1) y resultados de ensayos aleatorizados multicéntricos (genotipos 2 y 3). La determinación de ARN puede sustituirse por la cuantificación de antígeno core cuando el nivel de antígeno basal es  $\geq 200$  pg/ml.

finida como la ausencia de ARN en suero ( $< 50$  UI/ml) 6 meses después de finalizado el mismo<sup>9-12</sup>. Con esta definición se consigue RVS en algo más del 50% de pacientes tratados durante 24-48 semanas<sup>9</sup> (45-55% de pacientes con genotipo 1, 4, 5 o 6 tratados durante 48 semanas y 80% en pacientes con genotipos 2 o 3 tratados durante 24 semanas). Se define como respuesta virológica precoz (RVP) la desaparición del ARN o una disminución de la carga viral  $\geq 2$  logaritmos (99% de reducción con respuesta a la carga viral basal) a las 12 semanas de tratamiento<sup>10</sup>. Los pacientes con genotipo 1 que no logran una RVP no tienen ninguna posibilidad de alcanzar RVS, por lo que se recomienda suspender el tratamiento para disminuir costes y evitar efectos adversos innecesarios<sup>10-12</sup>. Esta regla es aplicable también a los pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana<sup>11</sup>. La ausencia de respuesta virológica (ARN  $< 50$  UI/ml) a las 24 semanas de tratamiento o al final del tratamiento (RVFT) es altamente predictiva de recidiva postratamiento, por lo que debe determinarse el ARN sérico en ambos momentos<sup>10-12</sup>. Estudios recientes han demostrado que en pacien-

tes infectados con genotipos 2 o 3 el tratamiento puede incluso acortarse a 12-16 semanas en aquellos pacientes con una respuesta viral muy precoz (ARN  $< 600$  UI/ml a las 4 semanas), independientemente de la carga basal en genotipos 2 y en genotipos 3 con carga basal  $< 800.000$  UI/ml<sup>13,14</sup>. Incluso en pacientes con genotipo 1 y carga basal inferior a  $600.000$  UI/ml que responden precozmente (ARN  $< 50$  UI/ml a las 4 semanas) se han observado respuestas mantenidas del 89%<sup>15</sup>. La figura 3 muestra un posible algoritmo para la monitorización del tratamiento de la hepatitis crónica C en función del genotipo y carga viral basal.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*. 2002;122:1554-68.
2. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Use of virologic assays in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis*. 2005;9:371-82.

3. Ferreira González A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis.* 2004;24 (Suppl 2):9-18.
4. Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol.* 2005;32:92-101.
5. Lee SC, Antony A, Lee N, Leibow J, Yang JQ, Soviero S, et al. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4171-9.
6. Hendricks DA, Friesenhahn M, Tanimoto L, Goergen B, Dodge D, Comanor L. Multicenter evaluation of the VERSANT HCV RNA qualitative assay for detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2003;41:651-6.
7. Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmman D, Babel R, Mihm U, Hofmann WP, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol.* 2006;44:729-37.
8. Halfon P, Khiri H, Gérolami V, et al. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Hepatol.* 1996;25:307-11.
9. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 2004;140:346-55.
10. Davis G, Wong J, McHutchson JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38:645-52.
11. Bräu N. Treatment of chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus-coinfected patients in the era of pegylated interferon and ribavirin. *Semin Liver Dis.* 2005;25:33-51.
12. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C: June 10-12, 2002. *Hepatology.* 2002;36:S3-20.
13. Von Wagner M, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, Heintges T, et al. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;129:522-7.
14. Mangia A, Santoro R, Minerva N, Ricci GL, Carretta V, Persico M, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med.* 2005;352:2609-17.
15. Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, et al. Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viraemia. *J Hepatol.* 2006;44:97-103.