检测153例儿童Kikuchi-Fujimoto病患者淋巴结组织中的分枝杆菌及疱疹病毒

徐哲^{1,2,3}, 刘盈¹, 李海静^{3,4}, 孟淑芳³, Alan S. Boyd³, Charles W. Stratton³, 马琳^{1*}, 汤一苇^{3,5,6*}

1. 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院皮肤科, 北京 100045;
2. 北京市顺义区妇幼保健院, 北京儿童医院顺义妇儿医院皮肤科, 北京 101300;
3. Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, 37232, USA;
4. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York 10029, USA;
5. Department of Laboratory Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York 10065, USA;
6. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Medical College of Cornell University, New York 10065, USA

* 联系人, E-mail: bch_maleen@aliyun.com; tangy@mskcc.org

收稿日期: 2018-07-25; 接受日期: 2018-08-05; 网络版发表日期: 2018-09-05

北京市自然科学基金(批准号: 7162060)、北京市顺义区卫生计生科技发展专项(批准号: Wsjkyfzxx-z-02)、北京儿童医院顺义妇儿医院妇幼健康基金(批准号: FYJK2016)、北京市医院管理局临床医学发展专项(批准号: ZYLX201601)、首都医科大学基础临床合作研究基金(批准号: 16JL22)和美国国立卫生研究院基金(批准号: CA008748)资助

摘要 Kikuchi-Fujimoto病(KFD), 又称为组织坏死性淋巴结炎, 是儿童的一种自限性疾病. 一些研究表明其病因与微生物有关. 既往研究显示, 特定病原体的存在与临床、病理以及实验室检查结果之间没有明确关联. 采用基于PCR的分子检测在KFD淋巴结组织中检测并鉴定分枝杆菌、疱疹病毒和细小病毒B19的DNA. 收集2001~2010年间福尔马林固定后石蜡包埋的KFD淋巴结活检标本153例. 在19例(12.4%)组织中检测到分枝杆菌DNA, 包括 *Mycobacterium intracellulare*, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. conceptionense*, *M. riyadhense*, *M. vanbaalenii*和*M. monacense*各1例; *M. fortuitum*, *M. kansasii*和*M. mucogenicum*各2例以及未明确的其他分枝杆菌5例. PCR方法也检测到10例(6.5%)细小病毒B19, 3例(2%) EBV, 1例(0.6%) CMV, 1例(0.6%) HHV-6, 1例(0.6%) HHV-7和5例(3.3%) HHV-8. 本研究结果确定了KFD淋巴结组织中分枝杆菌以及病毒特异DNA的存在, 但其临床以及病理学相关性未明. 本研究是目前最大的采用覆盖分枝杆菌以及病毒病原体的分子技术的KFD研究.

关键词 Kikuchi-Fujimoto病, 分枝杆菌, 细小病毒, 疱疹病毒, PCR检测

Kikuchi-Fujimoto病(Kikuchi-Fujimoto disease, KFD), 又称为组织坏死性淋巴结炎, 最早由两名日本病理学家Kikuchi和Fujimoto于1972年报道^[1,2]. 该病是

一种伴有大量组织细胞以及大量核碎片的网状细胞局灶增生性淋巴结炎^[3]. KFD好发于20~35岁的女性, 在亚洲患病男女性别比为1:4^[4], 在亚洲以外地区比如美

引用格式: 徐哲, 刘盈, 李海静, 等. 检测153例儿童Kikuchi-Fujimoto病患者淋巴结组织中的分枝杆菌及疱疹病毒. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 1020–1025, doi: [10.1360/N052018-00129](https://doi.org/10.1360/N052018-00129)
英文版见: Xu Z, Liu Y, Li H J, et al. Detection of mycobacterial and viral DNA in Kikuchi-Fujimoto disease: an analysis of 153 Chinese pediatric cases. Sci China Life Sci 2017, 60: 775–777, <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9087-6>

国和欧洲也有KFD病例报道^[5,6]. 儿童KFD患者于1980年在日本由Fujio首次报道. 随后, Sun在1983年报道了8例中国儿童患者, 之后越来越多的儿童病例被报道. 儿童患者占了全世界KFD患者的19%^[7]. KFD主要临床表现为发热和伴或不伴有疼痛的颈部淋巴结肿大, 年轻患者无特异性症状^[8]. 实验室检查也非特异, 诊断依据淋巴结活检发现的特征性病理表现. KFD的诊断通常是基于淋巴结的凝固性坏死, 组织细胞浸润, 淋巴结结构的消失以及多形核白细胞缺乏. KFD的急性或亚急性淋巴结肿大和全身症状易误诊为恶性淋巴瘤和自身免疫性疾病^[9-11]. 一旦误诊, 可能导致对病人可能有害以及不必要的评估和治疗.

KFD是一种罕见的良性自限性疾病, 病因不明, 有报道称各种抗原和感染与其急性、自限性的特征相关. 一些患者脸上可出现皮疹皮肤红斑(图1). 各种病原体, 包括刚地弓形虫、小肠结肠炎耶尔森菌、分枝杆菌、人类疱疹病毒6、7和8型、乙型肝炎病毒、细小病毒B19和Epstein-Barr病毒(EBV)被认为可参与致病, 但具体病因尚未明确^[12-20]. 许多研究表明, KFD与很多其他自身免疫疾病相关. 一些研究者认为该病为系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的罕见表现^[21,22]. 也有人推测KFD为发展中早期T细胞淋巴瘤的表现^[23].

在之前研究^[19]的基础上, 本研究组提出假说认为结核分枝杆菌、EBV和细小病毒B19或密切相关的疱疹病毒的慢性感染存在于KFD患者, 是KFD患者发病的可能病因. 本研究旨在扩大探索153例KFD患者淋巴结组织的发病原因进而寻找潜在的致病机制. 采用基于PCR的分子检测鉴定分枝杆菌类型、疱疹病毒和细小病毒B19, 从而充分揭示KFD的病因.

1 材料和方法

1.1 临床样本采集以及DNA提取

收集2001~2010年间北京儿童医院诊断为KFD的儿童患者福尔马林固定后, 经石蜡包埋的淋巴结样本共153例. 按照制造商说明书操作步骤(QIAamp DNA Tissue Kit, Qiagen, 美国)从每个组织块的3个10 μm 部分提取DNA, 每份样品约25 mg, 在组织裂解前采用二甲苯处理以去除石蜡进而提取DNA. 之后, 采用紫外分光光度法测定DNA的质量.

图1 KFD患者面部红斑

1.2 KFD病例回顾

对2001~2010年间KFD儿童患者均进行回顾性分析及组织病理学特点回顾. 从病历中收集临床特征、受累淋巴结状况、相关症状和实验室检查结果. 典型的组织学表现为突出的界限分明的副皮质区凝固性坏死伴大凋亡碎片和纤维蛋白沉积, 而中性粒细胞或浆细胞缺乏. 组织学分类根据主要细胞类型以及存在或不存在坏死(增生型或淋巴组织细胞型、坏死型、黄色瘤型或吞噬型). 坏死存在于所有情况, 每个KFD病例根据病理表现不同被分为三型(图2): (i) 增生型-PT (proliferative type-PT, 图2A), (ii) 坏死型-NT (necrotizing type-NT, 图2B); (iii) 黄色瘤型-XT (xanthomatous type-XT, 图2C).

1.3 分枝杆菌检测和鉴定

(1) 使用Myco-ID液相芯片系统检测和鉴定组织中的分枝杆菌. 扩增*M. tuberculosis* 16S-23S ITS的221-bp部分, 采用如前所述的广谱引物^[24]. 25 μL 的反应体系包括: 1 $\times$ 缓冲液, 0.75 mmol/L MgCl_2 , 10%甘油, 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 0.025 units/L *AmpliTaq Gold* DNA聚合酶(Applied Biosystems, 美国), 和 2.5 μL DNA. 样本95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性15 min, 之后94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 扩增40个循环, 最终72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸3 min, 然后4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

(2) 设计探针. 合成的寡核苷酸捕获探针包括分

图2 淋巴结组织的病理学形态特征(HE染色)

A: 增生型, 显示局灶性坏死和单核细胞浸润的淋巴结(HE×100); B: 坏死型, 可见淋巴细胞浸润的增殖坏死区, 展示大量吞噬细胞(HE×50); C: 黄色瘤型局灶性坏死区, 展示丰富的浆细胞样单核细胞、新月体组织细胞, 可见核尘(HE×100)

枝杆菌属特异(MYC)和35个种属特异性探针, 每个探针均用5' Amino Modifier C12修饰以提供一个终端胺偶联羧基微球(Integrated DNA Technologies, Inc., 美国). 捕获探针被设计成20个核苷酸, 与PCR产物的生物素化链序列互补, 如前所述^[25].

(3) xMAP悬浮阵列系统使用50 μ L的反应体系, 并于45℃在Luminex (Austin, TX)200分析仪上分析. 15 μ L杂交缓冲液混合33 μ L珠子混合试剂和2 μ L PCR产物. 2 μ L的杂交溶液含有5000个探针偶联微球组的混合物.

(4) 分枝杆菌鉴定按以下组、群或者种属分类: (i) *M. tuberculosis*组, 包括*M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*和*M. tuberculosis*; (ii) *M. marinum*-*M. ulcerans*组, 包括*M. marinum*和*M. ulcerans*; (iii) *M. chelonae*-*M. abscessus*组, 包括*M. abscessus*, *M. chelonae*和*M. immunogenum*; (iv) *M. fortuitum*组, 包括*M. fortuitum*和*M. senegalense*; (v) *M. avium*; (vi) *M. gordonae*; (vii) *M. haemophilum*; (viii) *M. intracellulare*; (ix) *M. kansasii*; (x) *M. malmoense*; (xi) *M. mucogenicum*; (xii) *M. scrofulaceum*; (xiii) *M. simiae*; (xiv) *M. smegmatis*; (xv) *M. szulgai*; (xvi) *M. terrae*; (xvii) *M. xenopi*. 对属特异性探针而不对任何种特异性探针有反应的标本可考虑不常见的分枝杆菌存在, 然后用测序法确认特定的种属.

1.4 病毒检测

采用比色微量滴定板PCR系统检测8种疱疹病毒(herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2, CMV, EBV, varicella-zoster virus (VZV), HHV-6, HHV-7和HHV-8)的DNA, 方法如前所述^[26]. 分离提取出的DNA

在加入dignoxigenin-11-deoxyuridine triphosphate (dUTP)的条件下扩增, dignoxigenin-11-dUTP参与PCR产物的合成. PCR扩增完成后, 反应液变性与含有DNA捕获探针的杂交液混合. 由此产生的DNA复合物被抗地高辛-过氧化物酶复合物检测, 该复合物可识别在PCR过程中掺入扩增子的dignoxigenin-11-dUTP. 如果相应的靶DNA存在, 探针可以与之杂交, 得到的生物素化的DNA复合物被链霉亲和素包被的微量滴定板孔捕获. 为了避免放大产品污染, 试剂准备和PCR设置是在一个与扩增区空间隔开的“静态空气”装置中进行的.

1.5 统计分析

各组间差异分析采用卡方检验. $P \leq 0.05$ 认为有统计学意义. 使用标准定义计算敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值.

2 结果

2.1 KFD组织分枝杆菌DNA检测

本研究使用的MYC (属特异性)探针仅能杂交分枝杆菌属, 所有35个种特异性探针能与相应的种杂交. 与MYC探针有反应而不与任何一个种特异性探针有反应的样本被认为存在未培养的分枝杆菌. 通过扩增产物测序再次确定PCR的结果. 153例标本经过PCR检测. 在153例淋巴结中检测到19例分枝杆菌, 占有福尔马林包被淋巴结组织的12.42%. 表1列出19例分枝杆菌, 14例为已知种类, 其余5例为未培养的分枝杆菌. 在19例检测到的分枝杆菌中, 11例(10.8%)发现于增生型组织, 8例(15.7%)发生在坏死/黄色瘤型组织(表1).

表 1 Myco-ID分枝杆菌DNA检测(19 of 153)

分枝杆菌	例数	分枝杆菌	例数
<i>M. riyadhense</i>	1	<i>M. fortuitum</i>	2
<i>M. avium</i>	1	<i>M. abscessus</i>	1
<i>M. intracellulare</i>	1	<i>M. mucogenicum</i>	2
<i>M. smegmatis</i>	1	<i>M. conceptionense</i>	1
<i>M. kansasii</i>	2	<i>M. monacense</i>	2
<i>M. vanbaalenii</i>	1	<i>M. Uncultured</i>	4
11 (10.8%)例存在于增生型, 8 (15.7%)例存在于坏死/黄色瘤型(19例/153例)			

2.2 KFD组织8种疱疹病毒以及细小病毒B19检测

HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8和parvovirus B19是在KFD患者最常研究的病毒。HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV, HHV-6, HHV-7和HHV-8属于人类疱疹病毒。153例FFPE淋巴结中共21例检测到病毒DNA。检测到的病毒DNA包括CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8和parvovirus B19。其中包括10例parvovirus B19, 1例CMV, 3例EBV, 1例HHV-6, 1例HHV-7和5例HHV-8 (表2)。HSV-1, HSV-2和VZV未在淋巴结组织中检测到, 提示HSV-1, HSV-2和VZV可能不参与KFD的致病。18例(17.6%)病毒DNA存在于增生型组织, 3例(5.9%)存在于坏死型/黄色瘤型组织。

2.3 淋巴结组织中分枝杆菌以及病毒阳性率

不同组织病理类型的分枝杆菌和病毒检出阳性率如表所示(表3)。102例增生型组织中有11例检测到分枝杆菌, 51例坏死型/黄色瘤型组织有8例检测到分枝杆菌。102例增生型组织中有18例检测到病毒, 51例坏死型/黄色瘤型组织有3例检测到病毒。在增生型组织中的分枝杆菌和病毒的阳性率高于在坏死型/黄色瘤型组织中分枝杆菌和病毒的阳性率, 数据没有统计学差异。分枝杆菌和病毒的阳性率高, 表明淋巴结中存在分枝杆菌和病毒。但是, 特异性的分枝杆菌或疱疹病毒病原体的检测与临床、病理及实验室检查之间没有明确的关联性。

3 讨论

KFD, 又称为组织坏死性淋巴结炎, 是最早由日本病理学家Kikuchi和Fujimoto于1972年报道的良性、自

限性疾病。患者典型表现为颈部淋巴结肿大, 有时伴发热、乏力以及恶心。反复发生可导致多系统损害、白细胞减少, 偶尔产生肝功能障碍。KFD的诊断基于淋巴结的形态特征, 包括坏死斑点、核碎片、组织细胞聚集, 中到大的淋巴细胞和浆细胞样T细胞增生, 中性粒细胞和嗜酸性粒细胞缺乏等。其中, CD68和MPO免疫组化染色可以确定组织细胞存在。

Kuo^[27]在1990年首先报道了1例伴皮肤病变的KFD患者。所观察到的皮肤病变为渗透着淋巴网状细胞和RS样细胞的斑块, 导致误诊为皮肤淋巴瘤。此后, 伴皮肤病变的KFD病例相继被报道。在30%的KFD病例可观察到皮肤病变。皮损组织病理改变复杂, 淋巴结具有特征性形态学改变。Atwater AR3回顾分析了具有皮肤活检组织学描述的50例患者。最常见的组织学改变为真皮淋巴组织细胞浸润。本文总结了伴皮肤病变KFD患者的临床及病理特点, 可分为3种主要的组织学亚型, 每种类型都有相对独立的临床特征。

根据皮损组织学改变进行诊断比较容易。但当有血管周围浸润时, 鼻型结外NK/T细胞淋巴瘤需要排除。结外NK/T细胞淋巴瘤表现为非典型淋巴细胞致密的真皮浸润, 常集中于皮肤附属器及血管并伴有一定程度的广泛坏死。受累皮肤附属器和血管显示真正的血管炎。病变通常与Epstein-Barr病毒感染有关, 最常见的免疫表型是CD2, CD56, 胞质CD3ε以及和细胞毒性颗粒阳性。

约17%有皮肤病变的KFD患者表现为真皮层非典型的淋巴细胞浸润, 很难与皮肤淋巴瘤区分。Kuo和本研究组报告的病例由于真皮内不典型淋巴样细胞浸润曾被诊断为皮肤淋巴瘤。从形态学来看, 不典型淋巴细胞浸润真皮而无表皮渗透, 这与嗜表皮淋巴瘤如斑块和斑块期蕈样肉芽肿病、皮肤原发性侵袭性CD8阳性细

表 2 比色微量滴定PCR病毒DNA检测

病毒	例数	病毒	例数
Parvovirus B19	10	EBV	3
CMV	1	HHV-6	1
HHV-7	1	HHV-8	5
18 (17.6%)例存在于增生型, 3 (5.9%)例存在于坏死/黄色瘤型(21例/153例)			

表 3 不同组织病理学类型检出率^{a)}

病原体	PT (N=102)	NT/XT (N=51)	OR (95% CI)	P值
<i>Mycobacteria</i> spp.	11	8	0.65 (0.244,1.732)	0.389
Viruses	18	3	3.43 (0.960,12.24)	0.058

a) PT, 增生型; NT, 坏死型; XT, 黄色瘤型. 分枝杆菌及病毒的检查率均无显著性差异

胞毒性T细胞淋巴瘤, 以及成人T细胞白血病/淋巴瘤不同. 既往的小样本研究显示了不同的病毒可能导致KFD的病因学诊断. 本研究在153例KFD中进行, 是目前采用涵盖分枝杆菌和病毒病原体的分子生物学技术的最大的研究, 所以研究结果对KFD的病因探索有很大

意义. 特异性病原体检测与临床、病理及实验室检查无显著关系. 本研究证实了结核分枝杆菌以及病毒特异性DNA在KFD淋巴结组织中的存在, 而其临床和病理学相关性仍然未知. 本研究是目前采用覆盖分枝杆菌以及病毒病原体的分子生物学技术最大的KFD研究.

参考文献

1 Kikuchi M. Lymphadenitis showing focal reticulum cells hyperplasia with nuclear debris and phagocytosis: a clinicopathological study. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi*, 1972, 35: 379–380

2 Fujimoto Y, Kojima Y, Yamaguchi K. Cervical subacute necrotizing lymphadenitis. *Naika*, 1972, 30: 920–927

3 Dorfman R F. Histiocytic necrotizing lymphadenitis of Kikuchi and Fujimoto. *Arch Pathol Lab Med*, 1987, 111: 1026–1029

4 Tsang W Y W, Chan J K C, Ng C S. Kikuchi’s lymphadenitis. *Am J Surgical Pathol*, 1994, 18: 219–231

5 Vassilakopoulos T P, Pangalis G A, Siakantaris M P, et al. Kikuchi’s lymphadenopathy: a relatively rare but important cause of lymphadenopathy in Greece, potentially associated with the antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int*, 2010, 30: 925–932

6 Deaver D M, Naghashpour M, Sokol L. Kikuchi-fujimoto disease in the United States: three case reports and review of the literature. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2014, 6: 2014001

7 Kim T Y, Ha K S, Kim Y, et al. Characteristics of Kikuchi-Fujimoto disease in children compared with adults. *Eur J Pediatr*, 2014, 173: 111–116

8 Astudillo L. La maladie de Kikuchi-Fujimoto. *La Revue de Médecine Interne*, 2010, 31: 757–765

9 Cunha B A, Mickail N, Durie N, et al. Fever of unknown origin (FUO) caused by Kikuchi’s disease mimicking lymphoma. *Heart Lung-J Acute Crit Care*, 2009, 38: 450–456

10 Ohta K, Endo N, Kaizaki Y. Axillary and intramammary lymphadenopathy caused by Kikuchi-Fujimoto disease mimicking malignant lymphoma. *Breast Cancer*, 2013, 20: 97–101

11 Patra A, Bhattacharya S K. SLE developing in a follow-up patient of Kikuchi’s disease: a rare disorder. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7: 752–753

12 Zhang W P, Wang J H, Wang W Q, et al. An association between parvovirus B19 and Kikuchi-Fujimoto disease. *Viral Immunol*, 2007, 20: 421–428

13 Huh J, Chi H S, Kim S S, et al. A study of the viral etiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi-Fujimoto disease). *J Korean Med Sci*, 1998, 13: 27–30

14 Martinez-Vazquez C, Potel C, Angulo M, et al. Nosocomial Kikuchi’s disease—a search for herpesvirus sequences in lymph node tissues using PCR. *Infection*, 2001, 29: 143–147

- 15 Nopvichai C, Sanpavat A, Sawatdee R, et al. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* in necrotising non-granulomatous lymphadenitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a study in Thai patients. *J Clin Pathol*, 2009, 62: 812–815
- 16 Deaver D, Horna P, Cuaing H, et al. Pathogenesis, diagnosis, and management of Kikuchi-Fujimoto disease. *Cancer Control*, 2014, 21: 313–321
- 17 Cho M S, Choi H J, Park H K, et al. Questionable role of human herpesviruses in the pathogenesis of Kikuchi disease. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131: 604–609
- 18 Huh J, Kang G H, Gong G, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Kikuchi's disease. *Hum Pathol*, 1998, 29: 1091–1096
- 19 Rosado F G N, Tang Y W, Hasserjian R P, et al. Kikuchi-Fujimoto lymphadenitis: role of parvovirus B-19, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 8. *Hum Pathol*, 2013, 44: 255–259
- 20 Zhang W P, Wang J H, Wang W Q, et al. An association between parvovirus b19 and Kikuchi-Fujimoto disease. *Viral Immunol*, 2007, 20: 421–428
- 21 Vilá L M, Mayor A M, Silvestrini I E. Therapeutic response and long-term follow-up in a systemic lupus erythematosus patient presenting with Kikuchi's disease. *Lupus*, 2001, 10: 126–128
- 22 Kim S K, Kang M S, Yoon B Y, et al. Histiocytic necrotizing lymphadenitis in the context of systemic lupus erythematosus (SLE): Is histiocytic necrotizing lymphadenitis in SLE associated with skin lesions? *Lupus*, 2011, 20: 809–819
- 23 Lin C W, Chang C L, Li C C, et al. Spontaneous regression of Kikuchi lymphadenopathy with oligoclonal T-cell populations favors a benign immune reaction over a T-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117: 627–635
- 24 Xiong L, Kong F, Yang Y, et al. Use of PCR and reverse line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 mycobacterium species. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 3544–3550
- 25 Dunbar S A, Vander Zee C A, Oliver K G, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP™ system. *J Microbiol Methods*, 2003, 53: 245–252
- 26 Tang Y W, Espy M J, Persing D H, et al. Molecular evidence and clinical significance of herpesvirus coinfection in the central nervous system. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 2869–2872
- 27 Kuo T. Cutaneous manifestation of Kikuchi's. *Am J Surgical Pathol*, 1990, 14: 872–876