

Meningitis y encefalitis víricas en Uruguay. Relevamiento mediante técnicas de reacción en cadena de polimerasa aplicadas al líquido cefalorraquídeo de los grupos herpes, enterovirus y arbovirus como principales agentes etiológicos. A propósito de 59 casos

Dres. Ronald Salamano*, Cristina Scavone[†], Lic. Mariana Baz[‡],
Dres. Andrea Rey[§], Gabriel González[¶], Abayubá Perna^{††},
Pablo Cardinal^{‡‡}, Sara Lewin^{§§}, Juan Arbiza^{¶¶}, Dora Ruchanski^{†††}

Sección Neuroinfectología, Instituto de Neurología, Facultad de Medicina,
Universidad de la República. Montevideo, Uruguay

Resumen

Introducción: en nuestro país no existen trabajos sistemáticos relativos a la incidencia de virus que provoquen encefalitis y meningitis. Sí existen trabajos realizados en las décadas de 1960 y 1970 sobre seroprevalencia de arbovirus y poliovirus.

Mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) aplicada al líquido cefalorraquídeo (LCR) hoy es posible realizar en un breve lapso de tiempo un diagnóstico de certeza sobre diversos agentes virales responsables de estas neurovirosis.

Material y métodos: se exploró la incidencia de virus de la familia herpes, enterovirus y grupo arbovirus mediante técnicas de PCR aplicadas al LCR en pacientes VIH negativos.

Resultados: este trabajo presenta a 59 pacientes VIH negativos que padecieron encefalitis y meningitis de presumible etiología viral. Estos agentes son los responsables de la mayor cantidad de meningitis y encefalitis que suceden en nuestro continente.

* Prof. Agregado de Neurología, Instituto de Neurología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

† Profesora Titular de Neuropediatría, Instituto de Neurología, Hospital Pereira Rossell, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

‡ Magíster en Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay.

§ Prof. Adjunto de Neuropediatría, Instituto de Neurología, Hospital Pereira Rossell, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

¶ Neuropediatría, Instituto de Neurología, Hospital Pereira Rossell, Facultad de Medicina.

†† Asistente de Neurología, Instituto de Neurología, Hospital de

Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

‡ Residente de CTI, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

§§ Neurólogo, Instituto de Neurología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

¶¶ Profesor de Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay.

††† Licenciada en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay.

Correspondencia: Dr. Ronald Salamano

José E. Rodó 1714 Ap. 301. CP 11200. Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: rsalamano@hotmail.com

Recibido: 6/7/09.

Aceptado: 16/11/09.

Conclusiones: *el diagnóstico virológico final es posible realizarlo en más de la mitad de los casos presentados, predominando virus de la familia herpes tanto en niños como en adultos, no siendo despreciable la incidencia de enterovirus. No se detectó en este trabajo la presencia de arbovirus.*

Palabras clave: *ENCEFALITIS VIRAL - diagnóstico.
MENINGITIS VIRAL - diagnóstico.
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.*

Keywords: *ENCEPHALITIS, VIRAL - diagnosis.
MENINGITIS, VIRAL - diagnosis.
POLYMERASE CHAIN REACTION.*

Introducción

En la naturaleza se describen más de 100 virus con propiedades patógenas sobre el sistema nervioso central, sin embargo, excluido el virus de la parotiditis, la mayor parte de estos es posible agruparlos en la familia herpes, familia enterovirus y el grupo de los arbovirus. Algunos de ellos se manifiestan en forma esporádica, otros en forma epidémica y también en forma mixta. Es conocida la incidencia de los arbovirus en ciertas regiones de Estados Unidos en el fin del verano y comienzo del otoño, que pueden tener un carácter epidémico⁽¹⁾.

Existen pocos trabajos en la región del Cono Sur latinoamericano que identifiquen aquellos neurovirus circulantes^(2,3).

En nuestro país no existe un relevamiento sistemático en tal sentido. Sí existen comunicaciones de casos que permiten sospechar que algunos virus de las familias mencionadas son responsables de algunos cuadros de meningitis y encefalitis^(4,5).

Específicamente no existen comunicaciones relativas a arbovirus, conociéndose que en países vecinos (Argentina) existe circulando y produciendo patología el virus de San Luis⁽⁶⁻⁸⁾.

Sin embargo, hay trabajos de seroprevalencia en las décadas de 1960 y 1970 que muestran que existía en aquella época seropositividad (técnicas de anticuerpos fijadores de complemento y de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación) en nuestro medio, en muestras sanguíneas, del virus de la encefalitis equina del Este y del Oeste y del virus de San Luis^(9,10). Existiendo una comunicación personal realizada por el Dr. Somma de una encefalitis por el virus de la encefalitis equina del Oeste⁽¹¹⁾.

El uso de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en líquido cefalorraquídeo (LCR), han revolucionado el diagnóstico de estas dolencias permitiendo la amplificación del ácido desoxirribonucleico

(ADN) de la familia herpes y el ácido ribonucleico (ARN) de los enterovirus y arbovirus con alta sensibilidad y especificidad, especialmente en las dos familias referidas en primer lugar^(12,13).

En Uruguay se utilizan dichas técnicas en forma rutinaria a excepción de las relativas a la identificación de arbovirus.

El objetivo del presente trabajo es describir la realidad de las encefalitis y meningitis víricas en el Centro Hospitalario Pereira Rossell, Hospital de Clínicas y Centro Asistencial del Sindicato Médico del Uruguay (CASMU), que pudiesen tener como agentes etiológicos a los enterovirus, herpesvirus y arbovirus en una población de adultos y niños mediante técnicas de PCR aplicadas al LCR, así como observar el comportamiento de las diferentes variables que constituyen el citoquímico de este.

Material y método

Se realizó un estudio de tipo transversal, observacional en pacientes VIH negativos.

Definiciones operativas (definiciones de los autores):

Encefalitis: cuadro de claudicación de funciones focales o difusas del encéfalo en un contexto febril, con exámenes imagenológicos que excluyen colecciones supuradas intracraneanas y estudio del LCR que excluye etiología bacteriana y micótica sin evidencia de infección extraneurológica. En general de evolución aguda.

Se incluyeron, por lo tanto, aquellos pacientes que entraban en la definición establecida y se excluyeron aquellos que por imagenología presentaban un proceso expansivo tal como abscesos o empiemas cerebrales, presentar una hipoglucoorraquia menor a 0,35 mg/dl⁽¹⁴⁾ o tener un cultivo bacteriano o micótico positivo.

Meningitis: síndrome meníngeo febril, sin tratamiento antibiótico previo, con estudio de LCR que excluye etiología bacteriana y micótica, en ausencia de focalidad infec-

ciosa extraneurológica. En general de evolución aguda.

Se incluyeron, por lo tanto, aquellos pacientes que entraban en la definición mencionada y se excluyeron aquellos pacientes con hipoglucorraquia menor a 0,35 mg/dl⁽¹⁴⁾ o presentaban un cultivo positivo para bacterias u hongos.

Se analizaron muestras de LCR en pacientes que entraban en la definición operativa de encefalitis y meningitis desde octubre de 2001 hasta setiembre de 2006 de las siguientes instituciones: Centro Hospitalario Pereira Rossell, Hospital de Clínicas y CASMU.

A todas las muestras se les practicó citoquímico (número de células, tipo de células, glucorraquia, proteinorraquia, reacción de Pandy), cultivo para bacterias y hongos⁽¹⁴⁾.

Se compararon estas variables en las categorías de encefalitis adultos versus niños y meningitis adultos versus niños.

Se consideró niño a todo sujeto que tenía una edad menor a 15 años, siendo adulto el sujeto que tenía esta edad o más.

Técnicas de biología molecular

Se aplicaron las siguientes técnicas de biología molecular a las muestras de LCR: retrotranscripción y posterior PCR de polimerasa (RT-PCR) para enterovirus, herpesvirus y arbovirus. Todos los primers de este trabajo fueron cedidos por el Dr. Antonio Tenorio, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

Para la amplificación inicial de enterovirus y herpesvirus se utilizaron un total de 12 oligonucleótidos. Los primers de enterovirus fueron diseñados en una región del genoma altamente conservada llamada 5' NTR. Los primers de herpesvirus fueron diseñados para amplificar un sector del gen de la polimerasa. Luego de la amplificación inicial, los enterovirus y herpesvirus fueron identificados por nested PCR usando un total de 12 primers. La utilización de esta última técnica permitió identificar los enterovirus (EV), herpes simple 1 y 2 (HSV 1 y 2), varicela-zóster (VZV), citomegalovirus (CMV), herpes humano tipo 6 (HHV 6) y Epstein-Barr (EBV).

Para la amplificación de arbovirus (alphavirus, flavivirus y phlebovirus) se utilizaron un total de 12 primers y se amplificó una región del genoma conservada.

La detección de los agentes infecciosos se realizó por medio de geles de agarosa de alta resolución según el tamaño de la banda amplificada. Las bandas amplificadas esperadas fueron de 306 pb para enterovirus, 120 pb para HSV, 96 pb para VZV, 78 pb para CMV, 68 pb para HHV 6, 58 pb para EBV, 196 pb para alphavirus, 143 pb para flavivirus y 244 pb para phlebovirus.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15.0. De acuerdo con los objetivos del trabajo se utilizaron como medidas de resumen: a) para las variables continuas: media, desvío estándar; b) para las variables categóricas: proporciones.

Para la comparación entre proporciones se utilizó el test de chi cuadrado y para la comparación entre medias el test de Student o el test de Mann Whitney según las condiciones de aplicación. Se utilizó una probabilidad alfa de 0,05.

Resultados

Se incluyeron 59 pacientes (34 niños y 25 adultos).

La distribución por grupos etáreos y sexo se muestra en la tabla 1, observándose una similar proporción de pacientes tanto en niños y adultos relativa al total del sexo femenino y masculino. Las distribuciones de edades de cada sexo también fue similar. Con respecto a la distribución según diagnóstico predominaron las encefalitis (tabla 1).

En la tabla 2 se observa que la muestra es relativamente similar cuantitativamente entre las meningitis de adultos y niños, mientras que en las encefalitis predominaron los niños.

El diagnóstico clínico fue respaldado por las técnicas de PCR en un porcentaje cercano a 50% tanto en meningitis como en encefalitis (tabla 3).

En las encefalitis en niños predominaron claramente los virus de la familia herpes, sobre todo el HSV1; tres casos fueron adjudicados a enterovirus.

A la inversa, en las meningitis se detectaron enterovirus, solamente un caso fue adjudicado al HSV1 (tabla 4).

Con respecto al diagnóstico virológico final de adultos, en las encefalitis se detectó la encefalitis herpética por HSV1 y tres casos por enterovirus. Estos tres pacientes tenían en común compromiso inmunitario de diferente tipo. Mientras que en las meningitis los enterovirus domi-

Tabla 1. Distribución de la muestra según grupos etáreos y sexo

	Masculino	Femenino	Total
<1 mes	1	1	2
1 mes - 1 año	3	6	9
1-14 años	14	9	23
Adulto	12	13	25
Total	30	29	59

Tabla 2. Características del citoquímico del líquido cefalorraquídeo según diagnóstico clínico

	<i>Meningitis (media)</i>	<i>Encefalitis (media)</i>	<i>Valor p</i>
Células	157,62	90,67	DNS
Proteinorraquia (mg/dl)	41	55	DNS
Glucorraquia (mg/dl)	55	58	DNS

DNS: diferencia no significativa

Tabla 3. Tipo de células detectadas en el líquido cefalorraquídeo según diagnóstico clínico

<i>Predominio</i>	<i>Encefalitis n (%)</i>	<i>Meningitis n (%)</i>	<i>Total</i>
PMN	6 (27,3%)	4 (36,4%)	10 (30,3%)
50 y 50	3 (13,6%)	1 (9,1%)	4 (12,1%)
Linfomonocitario	13 (59,1%)	6 (54,5%)	19 (57,6%)
Total	22 (100,0%)	11 (100,0%)	33 (100,0%)

PMN:

Tabla 4. Meningitis

	<i>Adultos (media)</i>	<i>Niños (media)</i>	<i>Valor p</i>
Células	146,75	177,60	DNS
Proteinorraquia	0,58	0,22	0,022
Glucorraquia	0,52	0,59	DNS

DNS: diferencia no significativa

naron ampliamente (tabla 5).

Con respecto al citoquímico del LCR (número de células, proteínas y glucorraquia) no se encontró una diferencia significativa en los diferentes parámetros del citoquímico del LCR cuando se comparó meningitis (adultos versus niños) versus encefalitis (adultos versus niños) (tabla 2).

El predominio celular correspondió a los linfomonocitos (tabla 3).

Cuando se comparó entre la población con meningitis de adultos versus meningitis niños y encefalitis adultos versus meningitis niños, la proteinorraquia de los niños fue significativamente menor; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de celularidad y glucorraquia (tablas 4, 5 y 6).

Comentarios

Se trata de un estudio de serie de casos, con una muestra no aleatorizada, por lo cual las conclusiones y generalización de los resultados es limitada.

Del total de los casos, 70% padecieron de encefalitis y el resto de meningitis. Interpretamos que este puede ser un sesgo de la muestra recogida, especialmente en niños, donde el diagnóstico de encefalitis por su gravedad lleva inmediatamente a la punción lumbar, mientras que los casos de meningitis pueden ser leves y transcurrir hacia la mejoría en cuestión de horas o días. Recordar que la mayoría de las encefalitis se detectaron en niños (60% versus 40%), mientras que las meningitis se detectaron casi por igual en niños y adultos.

Tabla 5. Encefalitis			
	<i>Adultos (media)</i>	<i>Niños (media)</i>	<i>Valor p</i>
Células	148,73	32,60	DNS
Proteinorraquia	0,7854	0,3279	0,001
Glucorraquia	0,5920	0,5653	DNS

DNS: diferencia no significativa

Tabla 6. Adultos versus niños (encefalitis versus meningitis)			
	<i>Adultos (media)</i>	<i>Niños (media)</i>	<i>Valor p</i>
Células	148	68	DNS
Proteinorraquia	0,71	0,29	<0,0001
Glucorraquia	0,57	0,57	DNS

DNS: diferencia no significativa

En más de la mitad de los casos de las encefalitis y en la mitad de las meningitis no se llegó a un diagnóstico definitivo desde el punto de vista del diagnóstico por biología molecular del agente causal, hecho referido en la literatura consultada, en porcentajes de 30% a 85%, según diferentes series⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Globalmente en las encefalitis en niños predominan virus de la familia herpes (especialmente el HVS 1, CMV y VZ, en ese orden) y enterovirus. El hallazgo de dos niños inmunocompetentes con encefalitis a CMV es excepcional, aunque existen comunicaciones al respecto⁽¹⁶⁾.

En adultos se detectaron sobre todo HVS 1 y tres pacientes con enterovirus (destacando que estos adultos poseían factores de inmunodepresión: paciente con neoplasia pulmonar en tratamiento quimioterápico, paciente portador de una enfermedad de Behcet, y paciente adulto joven con alteraciones en la inmunidad humoral).

En las meningitis predominan los enterovirus tanto en niños como en adultos, como era de esperar. Aunque es de destacar la existencia de dos casos en adultos provocados por VZ. En los casos de meningitis y encefalitis recogidos no se pudo detectar la existencia de arbovirus.

A pesar de que el análisis del citoquímico pudiese tener la limitante de que no hubo homogeneidad de los examinadores del LCR, el comportamiento de este fue el esperado y descrito en la literatura tanto para meningitis y encefalitis ya sea en niños o adultos: una pleocitosis del orden de decenas, predominio linfomonocitario, con glucorraquia normal y proteínas ligeramente aumentadas⁽¹⁾, a excepción de los niños.

La proteinorraquia normal en niños sanos suele ser mayor que en adultos, especialmente en neonatos y lactantes⁽¹⁷⁾, el hallazgo de una proteinorraquia descendida en aquellos niños que padecen encefalitis y meningitis con respecto a los adultos es inesperada para los autores, no teniendo estos explicación para este fenómeno.

Conclusiones

De acuerdo con las muestras analizadas no circularían, en el período establecido, arbovirus como responsables de meningitis y encefalitis víricas. La mayoría de las encefalitis en pacientes VIH negativos son consecuencia de virus de la familia herpes (destacando el HVS-1), lo que refuerza la conducta de aplicar antivirales (especialmente aciclovir) ante la eventualidad de una encefalitis presumiblemente viral. Con respecto a las meningitis se corrobora lo mencionado en la literatura internacional, o sea la amplia incidencia de enterovirus como causantes de estas. En el mismo sentido son las conclusiones relativas al citoquímico.

Summary

Introduction: in our country there are no systematic studies on the incidence of virus as a cause of encephalitis and meningitis. However, some studies on the seroprevalence of arbovirus and poliovirus were carried out in the sixties and seventies. Today, the polymerase chain reaction (PCR) applied to cerebrospinal fluid technique allows us to obtain accurate diagnosis within a short

time, on the different viral agents that cause these neuroviroses.

Method: we explored the incidence of virus from the herpesvirus, enterovirus and arbovirus group through PCR techniques applied to HIV negative patients.

Results: this study included 59 HIV negative patients who suffered from encephalitis and meningitis of viral etiology. These agents are responsible for most of the cases of meningitis and encephalitis in our continent.

Conclusions: the final viral diagnosis may be obtained in over half of the cases presented. The herpesvirus is the most frequent both in children and in adults, being it significant the incidence of enterovirus. No arbovirus were identified in this study.

Résumé

Introduction: dans notre pays, il n'existe pas de travaux systématiques relatifs à l'incidence des virus qui provoquent encéphalite et méningite. Il existe des travaux sur séroprévalence d'arbovirus et poliovirus faits entre 1960 et 1970.

Au moyen de la technique d'amplification en chaîne de polymérase (PCR) appliquée au liquide céphalorachidien (LCR), il est aujourd'hui possible de réaliser promptement un diagnostic certain sur divers agents viraux responsables de ces neuroviroses.

Matériel et méthode: on explore l'incidence de virus de la famille herpès, entérovirus et arbovirus par des techniques de PCR appliquées au LCR chez des patients VIH négatifs.

Résultats: ce travail présente 59 patients VIH négatifs qui subissent encéphalite et méningite de probable étiologie virale. Ces agents sont les responsables de la plupart des méningites et des encéphalites présentes dans notre continent.

Conclusions: le diagnostic virologique final est possible pour la moitié des cas présentés, étant le virus de famille herpès prédominant chez les enfants et les adultes, l'incidence d'entérovirus restant importante.

La présence d'arbovirus ne fut pas repérée.

Resumo

Introdução: no nosso país não existem estudos sistemáticos relativos à incidência de vírus que provoquem encefalites e meningites. Existem trabalhos realizados nas décadas de 1960 e 1970 sobre a soroprevalência de arbovírus e de poliovírus.

Utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido cefalorraquidiano (LCR) é possível realizar, em pouco tempo, um diagnóstico de certeza sobre diversos agentes virais responsáveis por estas neuroviroses.

Material e métodos: buscou-se determinar a incidência de vírus das famílias herpes, enterovírus e grupo arbovírus pelas técnicas de PCR no LCR de pacientes VIH negativos.

Resultados: este trabalho apresenta 59 pacientes VIH negativos que tiveram encefalite ou meningite com provável etiologia viral. Estes agentes são responsáveis pelo maior número de casos de meningite e encefalite no nosso continente.

Conclusões: em mais da metade dos casos apresentados foi possível realizar o diagnóstico virológico final; registrou-se uma predominância dos vírus da família herpes tanto em crianças como em adultos sendo que a incidência de enterovírus não era desprezível. Não se detectou a presença de arbovírus.

Bibliografía

1. **Johnson RT.** Viral Infections of the Nervous System. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.
2. **Spinsanti L, Ré V, Díaz MP, Contigiani MS.** Age related seroprevalence study for St. Louis encephalitis in a population from Cordoba, Argentina. Rev Inst Med Trop S Paulo 2002; 44(2): 59-62.
3. **Sabattini MS, Monath TP, Mitchell CJ, Daffner GS, Bowen R, Pauli R, et al.** Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. I. Historical aspects and descriptions of study sites. Am J Trop Med Hyg 1985; 34(5): 937-44.
4. **Salamano R, Ormaechea R, Perna A, Lorenzo J, Dansilio S, Ketzoian C, et al.** Encefalitis herpética: a propósito de un caso clínico (importancia del diagnóstico y tratamiento precoz). Rev Med Urug 1999, 15(1): 66-70.
5. **Perna A, Lewin S, Baz M, Salamano R.** Enterovirus del SNC: a propósito de dos casos clínicos. Arch Med Interna (Montevideo) 2005; 27(4): 101-4.
6. **Spinsanti L, Basquiera AL, Bulacio S, Somale V, Kim S, Ré V, et al.** Encefalitis de San Luis en Argentina: el primer caso comunicado en los últimos 17 años. Centres for Disease Control and Prevention. 2003; 9(2). Disponible en: http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no2/02-0301_span.htm. (Consultado: mayo 2009).
7. **Mettler NE, Casals J.** Isolation of St. Louis encephalitis virus from man in Argentina. Acta Virol 1971; 15(2): 148-54.
8. **Durlach RA, Astarloa L.** Meningoencefalitis por virus de encefalitis de San Luis. Medicina (B. Aires), 1985; 45(4): 467-8.
9. **Somma R.** Encefalitis Virósicas. Medicina en el Uruguay 1969-1970. Montevideo: Warner-Chilcott, 7: 5-30.
10. **Somma R, Campione P, Russi JC, Hortal de Giordano M, Bauzá CA, Peluffo G, et al.** Arbovirus en el Uruguay. Arch Pediatr Urug 1970; 41(4): 359-63.
11. **Somma R.** Diagnóstico de una Encefalitis Equina del Oeste. Comunicación personal. In: Encefalitis Virósicas, Medicina en el Uruguay 1969-1970, Warner-Chilcott, Montevideo, 7: 11.
12. **Casas I, Tenorio A, Echevarría JM, Klapper PE, Cleator GM.** Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. J Virol Methods 1997; 66(1): 39-50.
13. **Arroyo H, Bologna R.** Encefalitis Viral. Rev Neurol 1997; 25(142): 912-9.
14. **Machado L, Livramento JA, Spina-Franca A.** El examen

- del líquidocefalorraquídeo en las neuroinfecciones. In: Salamano R, Scavone C, Waskopf S, Savio E, coords. Neuroinfecciones en el adulto y el niño. Montevideo: ARENA, 2008: 29-38.
15. **Glaser C, Gilliam S, Schnurr D, et al.** In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project; 1998-2000. *Clin Infect Dis* 2003; 36(6): 731-42 .
 16. **Donoso O, Vaheri A, Ambrose H, et al.** Analysis of the surveillance situation for viral encephalitis and meningitis in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13(1-3). Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EQ/V13N01/V13N01.pdf> (Consultado: mayo 2009).
 17. **Darin N, Bergström T, Fast A, Kyllerman M.** Clinical, serological and PCR evidence of cytomegalovirus infection in the central nervous system in infancy and childhood. *Neuropediatrics* 1994; 25(6): 316-22.
 18. **Michelson D.** Spinal fluid examination. In: Swaiman K, Ashwal S, Ferriero D. *Pediatric Neurology: principles and practice*, vol. 1. 4a ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006: 153-165.