مطالعه روند ایجاد تغییرات سلولی در کشتهای سلولی آلوده به *پستی ویروس ها* به روش ایمونوفلورسانس مستقیم

دکتر فرهید همت زاده[1*] دکتر هادی کیوانفر[1] دکتر مریم بادوام[2] محمد طاهری[3]

دریافت مقاله: ۱۲ بهمن ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۲۱ دی ماه ۱۳۸۲

هدف: این بررسی به منظور مطالعه روند ایجاد تغییرات سلولی در کشتهای سلولی آلوده به سویه های سیتوپاتوژن و غیر سیتوپاتوژن *پستی ویروس های* جدا شده از گاو و گوسفند انجام گرفت.

طرح: مطالعه مشاهده ای.

روش: پس از آلوده نمودن کشتهای سلولی R-BK آماده شده در لوله های لیتون با سویه NADL ویروس BVD و یک سویه ویروس بیماری Border و همچنین یک سویه غیر سیتوپاتوژن ویروس BVD به رنگ آمیزی نمونه ها با پادتن فلورسنت ضد *پستی ویروس* و مشاهده روزانه نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت اقدام گردید.

نتایج: در نمونه های آلوده به سویه های سایتوپاتیک و غیرسایتوپاتیک *پستی ویروس* در روزاول تنها حضور کانونهای پادگن ویروسی بدون بروز تغییرات مشهود سلولی جلب توجه می نمود. درنمونه های آلوده به سویه های cp در روز دوم علاوه بر گسترش کانونهای عفونی آثار اولیه تغییرات مرفولوژیک سلولی از قبیل تغییر در اندازه و تمایل به گرد شدن دیده شد، در روز سوم کانون CPE در نقاط مختلفی از کشت تک لایه که با تجمع شدید پادگن ویروس در اطراف کانون CPE، گرد شدن و کنده شدن سلولهای آلوده مشاهده گردید و در نهایت در روزهای چهارم و پنجم تقریباً همگی سلولها آلوده شده و نشانیهای CPE را نشان می دادند. در حالی که در کشتهای سلولی آلوده به سویه غیر سیتوپاتیک ویروس BVD در مطالعه روزانه تنها گسترش کانونهای عفونی با سرعتی بسیار کمتر از سویه های سیتوپاتیک دیده می شد و تا روز ششم اثری از ایجاد CPE مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: روش ایمونوفلورسانس مستقیم قدرت تشخیص کشتهای سلولی آلوده به *پستی ویروس* را حتی در چند ساعت اولیه پس از عفونت و قبل از شکل گیری CPE در کشت های آلوده به سویه های سیتوپاتوژن و غیر سیتوپاتوژن دارد.

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۲، ۱۷۸-۱۷۵.

واژه های کلیدی: *پستی ویروس*، ایمونوفلئورسانس، سویه سیتوپاتوژن، سویه غیر سیتوپاتوژن، کشت سلول.

اعضای جنس *پستی ویروس* به خوبی در کشتهای سلولی اولیه و ثانویه که از گونه های میزبان اصلی مشتق شده اند تکثیر می یابند. *پستی ویروس*های جدا شده از حیوانات بیمار اغلب در کشت سلولی اثرات سیتوپاتیک نداشته ولی می توانند طی پاساژهای متوالی واریانت های سیتوپاتیک تولید نماید. البته سویه های سیتوپاتیک ویروس BVD ممکن است به طور مستقیم از گاو مبتلا به بیماری مخاطی جدا شوند. حضور این دو نوع ویروس در میزبانهای مختلف منجر به بروز چهره های بالینی و اپیدمیک مختلف می شود (۱۱،۱۳،۱۷،۲۰).

۱) گروه آموزشی میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول fhemmat@ut.ac.ir

A study on cellular changes in inoculated cell cultures with *Pestivirus*, using direct immunoflurescence technique

Hemmatzadeh, F.,[1] Keyvanfar, H.,[1] Badavam, M.,[2] Taheri, M.[3]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. [2]Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. [3]Central Research Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

Objective: This study was carried out to find the progressive cellular changes developed in cell culture with cytopathic (cp) and noncytopathic (ncp) *pestiviruses* isolated from cow and sheep.

Design: Observational study.

Procedure: Following inoculating the R-BK cell cultures in Lighton tube with NADL strain of BVD, a cp strain of Border disease virus and a nocytopathic BVD, the cells were stained with FA and observed with IF microscope. In inoculated cultures with cp and ncp *pestivirus* obvious changes were present at the first day and multiple focal expression of viral antigens were seen.

Results: In the second day in cp inoculated cultures, the morphological changes began and antigenic spread were more intensive. In the 3rd day the CPE foci were seen in different parts of the cultured cells with high concentration of antigen around the CPE sites. The cells started to detach and became rounds and finally in the 4th and 5th day, almost all cells were antigen positive and developed CPE. However, those cultures inoculated with noncytopathic strain of BVD, in daily observation the antigenic spread was too slow and up to 6 days post inoculation no CPE were observed. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 2: 175-178, 2004.***

Key words: *Pestivirus*, Immunoflurescence, Cytopathic strain, Noncytopathic strain, Cell culture.

Corresponding author email:fhemmat@ut.ac.ir

انجام مطالعات تجربی بر روی این ویروس ها به علت حساس بودن ویروس، کم بودن میزان آنها در کشتهای سلولی و اشکالات فراوان در خالص سازی ویروس و غیر سایتوپاتیک بودن بسیاری از سویه های آنها در کشتهای سلولی بسیار وقت گیر بوده و ردیابی پادگن های ویروس به منظور تشخیص از سایر روشها معمولتر می باشد (۹).

ویروس BVD در اکثر کشتهای سلولی بدون آنکه CPE ایجاد نماید تکثیر یافته و بدون ایجاد تغییر در مورفولوژی یا سرعت تکثیر سلولها، باقیمانده و تکثیر می یابد. مشکل عمده در مطالعه *پستی ویروس* ها سیر آهسته رشد و کمبود اجزای ساختمانی ویروس در سلولهای آلوده به ویروس می باشد. بیشتر یافته های مربوط به بیولوژی مولکولی *پستی ویروس* ها در چند سال اخیر با استفاده از روشهای جدید به دست آمده است (۹،۱۱).

کشتهای سلولی متداول برای تکثیر یا جداسازی ویروسی شامل کشت سلولی اولیه بیضه گاو (C.T)، تیره سلولی کلیه خوک (Pk-15)، تیره سلولی OCP یا PSCP و کشت تیره سلولی کلیه جنین بره (FLK) می باشند. سایر کشتهای سلولی مناسب جهت کشت ویروس BVD شامل، کشتهای اولیه عضله جنین گاو، کشت عضله جنین گوسفند، کشت سلولهای مغز جنین گوسفند، تیره سلولی توربینیت گاو، کشت فیبروبلاست های جنین گاو، سلولهای کلیه و تیره سلولی MD-BK و تعداد دیگری از کشتهای سلولی با منشا گاو و گوسفند می باشند. ویروس های BVD و BD قادر به تکثیر روی نوع خاصی از سلولهای جهش یافته تیره سلول MD-BK نمی باشند که علت آن، عدم وجود گیرنده مناسب جهت اتصال *پستی ویروس* ها روی این نوع از سلولها می باشد (۹،۱۳).

با وجود اینکه روشهای جدید شناسایی ویروس پیشرفت کرده است ولی روش جداسازی *پستی ویروس* هنوز یک روش کاربردی برای تشخیص عفونت BVD است. سویه های سایتوپاتیک و غیر سایتوپاتیک ویروس BVD، در کشت سلول با مشاهده یا عدم مشاهده CPE تشخیص داده می شوند. اثرات سویه سایتوپاتیک ظرف ۳-۲ روز در کشت سلولی به صورت CPE مشاهده می شود، در صورتی که برای جدا کردن سویه های غیر سایتوپاتیک، نیاز به ۵-۳ روز کشت سلولی است. بیشترین سویه های ویروس BVD که در شرایط محیطی ایجاد بیماری می کنند سویه های غیرسایتوپاتیک هستند (۹،۱۷).

اگر کشت سلولی موجود در لوله های لیتون را با ویروس مولد CPE آلوده کرده و پس از ۷ روز با گیمسا رنگ نمایند، سلولهای آلوده ای که هنوز زنده اند در زیر میکروسکوپ نوری دارای حفره های بزرگ سیتوپلاسمی و گنجیدگیهای داخل هسته ای گرد می باشند، برخی سلولها نیز دراز و باریک شده و به شکل زنجیر به دنبال هم قرار می گیرند. میزان تکثیر ویروس در پاساژهای سوم به بعد در این کشت سلولی بسیار زیاد بوده و به حدود 10^6 TCID50/ml می رسد (۹،۱۵).

روشهای سریع تشخیص آنتی ژن ویروس BVD در نمونه های بافت، به وسیله روشهای ایمونوهیستوشیمی از قبیل رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس و ایمونوآنزیم در مقاطع بافتهای یخ زده امکانپذیر است. آنتی سرمهای پلی کلونال و یا منوکلونال تهیه شده علیه ویروس BVD برای ردیابی آنتی ژن ویروسی استفاده می شود. با استفاده از این روشها می توان بدون اینکه نیاز به جدا سازی ویروس باشد آنتی ژن ویروس BVD را در بافتهای فیکس شده مشخص نمود. تکنیکهایی که بر اساس استفاده از آنتی بادی های منوکلونال پایه ریزی می شود، حساستر و اختصاصی تر از آزمونهایی است که بر اساس آنتی بادی های پلی کلونال پایه ریزی شده است. همچنین روشهای سنجش ایمنی آنزیم حساستر از آزمون ایمونوفلورسانس می باشند (۶،۲۱).

به هرحال، روش ایمونوفلورسانس مستقیم با پادتن منوکلونال برای تسریع تأیید کلینیکی بیماری مخاطی و تشخیص عفونت پایدار ویروس BVD در گاو، بعد از ناپدید شدن پادتن کلستورومی توصیه می شود. استفاده از این روش به هنگام مواجهه با سندرم های گوارشی، تنفسی یا تناسلی بسیار مفید می باشد (۱،۷،۱۶).

مواد و روش کار

مواد مصرفی: کشت سلول R-BK (Razi Bovin Kidney)، محیط کشت سلولی MEM، محیط کشت سلولی استوکر، سرم جنین گاو، تریپسین ورسن، آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین، آمفوتریسین B، بافر فسفات سالین، الکل اتانول فوق خالص، استن، گلیسرین، پادتن کنژوگه فلورسانت ضد *پستی ویروس* (Bio X)، سویه NADL ویروس BVD، ویروس Border جدا شده در ایران و یک سویه غیر سیتوپاتوژن ویروس BVD.

وسایل: پلیت کشت سلولی، لام های فلورسنت، لوله لیتون، میکروسکوپ معکوس، میکروسکوپ فلورسنت.

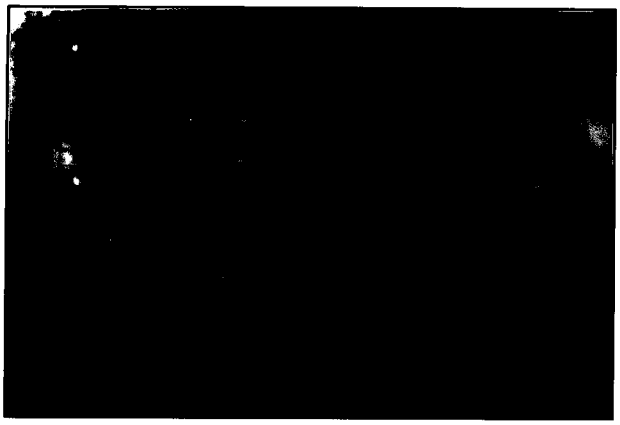
روش کار: آماده سازی و کشت سلول: برای این تحقیق از تیره سلولی R-BK که قبلاً عدم آلودگی آن به *پستی ویروس* های غیرسیتوپاتیک، به روش ایمونوفلورسانت تأیید شده بود استفاده شد. سویه های NADL ویروس BVD و ویروس بیماری Border پس از ۴ روز CPE مناسبی را در این تیره سلولی ایجاد می نماید. محیط کشت مناسب برای این تیره سلولی محیط کشت MEM می باشد.

انجام آزمون روی کشتهای سلولی: ابتدا تیره سلولی R-BK طی چند نوبت در تعدادی لوله لیتون استریل و حاوی لامل کشت داده شد. ۳-۲ روز بعد، پس از کامل شدن تک لایه سلولی، تعداد ۲۰۰ لوله لیتون حاوی لامل واجد کشت سلولی مناسب و با کیفیت انتخاب گردید. لوله ها به چهار گروه ۵۰ تایی تقسیم شدند. گروه اول کشتهای سلولی بودند که با سویه سیتوپاتیک NADL ویروس BVD آلوده شدند. گروه دوم نیز با یک سویه سیتوپاتیک ویروس Border آلوده شده و گروه سوم با یک سویه غیرسیتوپاتیک ویروس BVD که از یک گاو مبتلا به شکل پایدار عفونت با ویروس BVD جدا شده بود آلوده شدند و تعداد ۵۰ لوله باقی مانده نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شده و با ویروس خاصی آلوده نشدند.

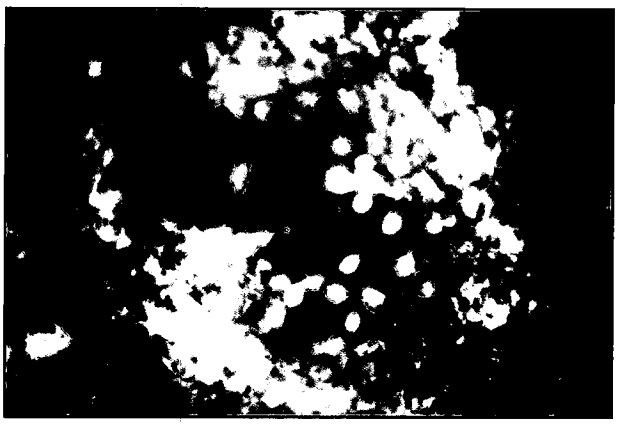
روز آلوده شدن روز صفر در نظر گرفته شد. در روز اول، تعداد ۱۰ نمونه لامل حاوی سلول از هر گروه با الکل اتانل استون سرد به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. عمل فیکس کردن در روزهای ۲، ۳، ۴ و ۵ روی نمونه های باقیمانده به ترتیب ذکر شده در بالا صورت گرفت. درپایان هر مرحله لامل های حاوی سلولهای فیکس شده با پادتن ایمنوفلئورسانس استاندارد مربوط به شرکت بیوایکس، مطابق دستورالعمل کیت برای رنگ آمیزی آماده گردیدند. در اولین مرحله پس از فیکس کردن نمونه ها، کلیه لامل ها با استفاده از محلول فسفات بافر سالین حاوی ۰/۵ درصد توئین ۲۰ و ۱ درصد، سرم آلبومین گاوی به مدت نیم ساعت انکوبه شده و با PBS شستشو گردیدند (۱۴).

جهت رنگ آمیزی ۵۰ میکرولیتراز رقت ۱/۲۰۰ پادتن نشاندار روی هر کدام از نمونه ریخته و سپس به مدت یکساعت در جار مرطوب در گرمخانه

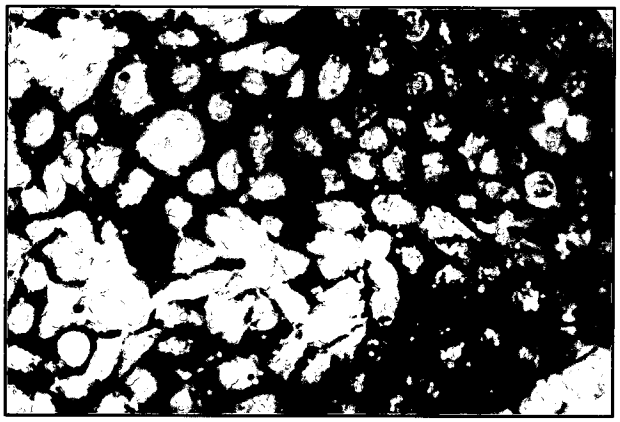
تصویر ۱- نمونه مثبت در کشت سلول، پیش از آغاز CPE روز اول پس از آلودگی.



تصویر ۲- نمونه کنترل منفی در کشت سلول.



تصویر ۳- نمونه مثبت در کشت سلول، آغاز CPE روز سوم پس از آلودگی.



تصویر ۴- نمونه مثبت در کشت سلولی آلوده به سویه های غیرسیتوپاتیک.

۳۷ درجه قرار می گرفت. لامل های هر گروه پس از خارج کردن از گرمخانه، حد اقل ۵ بار بااستفاده از PBS شستشو داده شده و سپس با استفاده از محلول تامپون گلیسیرین دار مونته گردیده و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی می شد. این آزمون جهت حصول اطمینان از صحت روش کار و همچنین تکرار پذیری آزمون یکبار دیگر در همین شرایط بر روی ۲۰۰ نمونه کشت سلولی دیگر انجام گرفت (۵).

نتایج

پس از رنگ آمیزی و مشاهده کشتهای سلولی آلوده و سالم مشخص گردید که حضور پادگن های *پستی ویروس* را می توان از یک روز بعد از آلودگی در کشتهای سلولی آلوده به سویه های سایتوپاتیک و غیرسایتوپاتیک پستی ویروس بدون مشاهده تغییرات مرفولوژیک به صورت کانونهایی پراکنده تشخیص داد (تصویر ۲).

در کشتهای آلوده به سویه های سایتوپاتیک در روز دوم علاوه بر گسترش کانونهای عفونی آثار اولیه تغییرات مرفولوژیک سلولی از قبیل تغییر در اندازه و تمایل به گرد شدن دیده شد، در روز سوم کانون CPE در نقاط مختلفی از کشت تک لایه که با تجمع شدید پادگن ویروس در اطراف کانون CPE، گرد شدن و کنده شدن سلولهای آلوده مشاهده گردید (تصویر ۳) و در نهایت در روزهای چهارم و پنجم تقریبا همگی سلولها آلوده شده و نشانیهای CPE را نشان می دادند. در حالیکه در کشتهای سلولی آلوده به سویه غیرسیتوپاتیک ویروس BVD در مطالعه روزانه تنها گسترش کانونهای عفونی با سرعتی بسیار کمتر از سویه های سیتوپاتیک دیده می شد و تا روز ششم اثری از ایجاد CPE مشاهده نگردید (تصویر ۴).

در نمونه های شاهد هم که هر روزه انتخاب شده و رنگ آمیزی می شدند اثری از ایجاد CPE یا پادگن های *پستی ویروسی* مشاهده نگردید و تنها در موارد نادری سلولهای مرده و شناور، فلورسانس مختصری را از خود نشان می دادند که احتمالاً به علت نفوذ رنگ در سیتوپلاسم سلولهای مرده می باشد (تصویر ۱).

بحث

مطالعه روند تغییرات سایتوپاتیک در عفونتهای ویروسی از پایه های اولیه مطالعه پاتوژنز ویروس ها می باشد. روند تغییرات سلولی و تحت سلولی متعاقب آلودگی با *پستی ویروس* ها قبلاً در تحقیقات برخی محققین به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین در کشتهای سلولی تهیه شده در لوله های لیتون با استفاده از سویه های سیتوپاتیک انجام گرفته است ولی با توجه به عدم ایجاد تغییرات مرفولوژیک مشهود در سلولهای آلوده به سویه های غیر سیتوپاتیک مطالعه خاصی بر روی سلولهای آلوده به این ویروس ها به روش هماتوکسیلین - ائوزین انجام نگرفته است. در این بررسی علاوه بر دو سویه سیتوپاتیک *پستی ویروس* یک سویه غیر سیتوپاتیک هم مورد بررسی قرار گرفته است. این ویروس طی مطالعات قبلی نویسندگان

از گاوهای مبتلا به شکل پایدار عفونت به ویروس BVD جدا شده است. عدم ایجاد تغییرات مرفولوژیک مشهود به همراه پراکندگی قابل توجه پادگن های ویروسی در سطح کشت سلولی آلوده به سویه غیرسایتوپاتیک، از یافته های جالب توجه این تحقیق می باشد که در تصاویر با کیفیت مطلوب توسط نویسندگان ارایه گردیده است (۳،۴،۷،۹).

قدرت تشخیص کانونهای سلولی آلوده حتی قبل از شکل گیری CPE امتیازی است که می توان از آن در مدت کوتاهی و حتی بدون نیاز به انجام آزمونهای تأیید تشخیص دیگر جهت شناسایی کشتهای سلولی مورد استفاده در تحقیقات و یا تولید فرآورده های بیولوژیک بهره برد. از آنجایی که درحدود ۹۵ درصد از *پستی ویروس* های نشخوارکنندگان غیرسایتوپاتیک بوده و اصولاً در کشتهای سلولی به طور مستقیم قابل تشخیص نمی باشند با به کارگیری این روش می توان درمدت زمانی کوتاه (قریب به ۸ ساعت) متعاقب ورود *پستی ویروس* به سیستم های کشت سلولی فعال، به راحتی حضور پستی ویروس های غیر سایتوپاتوژن را نیز تشخیص داد (۸،۱۳،۱۸،۲۱).

از آنجایی که برای تهیه پادتن پلی کلونال کنژوگه مورد استفاده در این تحقیق از سویه NADL ویروس BVD استفاده شده است واین سویه واجد اکثریت پادگن های مشترک بین انواع *پستی ویروس* ها می باشد بنابر این این پادتن توان بالایی در شناسایی پادگن های *پستی ویروسی* ویروس های سایتوپاتیک و غیرسایتوپاتیک دارد (۲،۳،۴،۱۲).

References

۱. کیوانفر، ه. همت زاده، ف. و محمودیان، ع. (۱۳۸۰): ویروس شناسی دامپزشکی (بیولوژی ویروس ها) انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۴۱.

۲. همت زاده، ف. (۱۳۸۰): ارزیابی به کارگیری آزمون ایمنوفلورسنت غیرمستقیم جهت تشخیص سرمی بیماری IBR، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران دوره ۵۶، شماره ۲، صفحه: ۶۵-۵۹.

۳. همت زاده، ف. (۱۳۸۰): ارزیابی به کارگیری آزمون ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی اسهال ویروسی گاوان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶ شماره ۱، صفحه: ۲۷۶-۲۶.

۴. همت زاده، ف. (۱۳۷۶): بررسی سرولوژیک بیماری بردر در ایران و مطالعه تجربی بیماری، پایان نامه دوره دکترای تخصصی میکروبیولوژی، شماره ثبت: ۵۹، صفحه: ۱۵-۱.

۵. همت زاده، ف.، کیوانفر، ه. و بادوام، م. (۱۳۸۱): ارزیابی تهیه پادتن فلورسنت جهت جستجوی پادگن های *پستی ویروسی*، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۴، صفحه: ۳۵-۲۷.

6. Afshar, A., Dulac, G.C., Dubuc, C. and Howard, T.H. (1991): Comparative evaluation of the flourescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detecting of bovine viral diarrhea virus from bull semen. Canadian J. Vet. Res. 55: 91-93.

7. Baker, J. C. (1995): The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. Vol. 11. 3: 425-445.

8. Bielefeldt-ohmann, H. (1995): The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. Vol. 11.3: 447-475.

9. Brock, K.V. (1995): Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infection. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. Vol. 11.3: 549-561.

10. Deng, R. and Brock, K.V. (1992): Molecular cloning and nucleotid sequence of *pestivirus* genom noncytopathic BVD strain SD_1.Virology. Vol. 15.1: 191-868.

11. Donis, R.O. (1995): Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its intraction with the host. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. Vol. 11.3: 393-423.

12. Edwards, S. and Paton, D.J. (1995): Antigenic difference among *pestiviruses*. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. Vol. 11.3: 563.

13. Hewicke, R., Trautwein,M., Traut, W.G., Moennig, V. and Liess, B. (1992): Infections of ovine fetal brain cell culture with cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. Vet. Microbiol. 33: 239-248.

14. Hudson Land Hay, F.C. (1991): Practical Immunology, Blackwell. Sci. Publica. PP: 281-290.

15. Moennig, V. (1990): *Pestiviruses*: a review. Vet. Microbiol. 23: 35-54.

16. Moening, V. and Liess, B. (1995): Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. Vol. 11.3: 477-487.

17. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzine, K.M.C. and Studdert, M.J. (1999): Veterinary Virology. Academic press. PP: 555-569.

18. Pistle, J., Wolf, G., Wolf, M.A., Beer, M., Pichler, J. and Kaaden, OR. (1997): Rapid detection of bovine viral diarrhea virus-P80/125 in blood leukocytes of viremic cattle with immunofluoresecence microscopy. Floria Vet. 41: 1-2, 21-24.

19. Potgieter, L.N.D. (1995): Immunology of bovine viral diarrhea virus. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. Vol. 11.3: 501-520.

20. Tsuboi, T. and Imada, T. (1996): Noncytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhea – mucosal disease viruses do not affect in vitro embryonic development into the blastocyst stage. Vet. Microbiol. 49: 127-134.

21. Zhou, Y., Moennig, V., Coulibaly, Coz., Dahle, J. and Licss, B. (1989): Differentiation of hog cholera and bovine virus diarrhea viruses in pigs using monoclonal antibodies. Vet. Pub. Heal. 36: 76-80.