

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR
Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real-time PCR

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บุรณี พัววงษ์แพทย์ รุ่งนภา ทองเคิ่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR ดำเนินการโดยได้ออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อ *pth A* gene ของ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้แก่ pth154R / pth154F: และ J-RTpth3/ J-RTpth4 และ J-Taqpth2b ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงพบว่า primer ที่สังเคราะห์มา มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* อยู่ในระหว่างการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR และทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคแคงเกอร์จากแปลงปลูก

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-02-54



คำนำ

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของพืชตระกูลส้ม สามารถเข้าทำลายต้นส้มได้ในทุกส่วนของต้น และมักพบระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน เมื่อเป็นโรคมักจะทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบร่วงต้นแคระแกรน ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (= *Xanthomonas campestris* pv. *citri*) จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถแบ่งกลุ่มตามการแพร่ระบาดในแหล่งต่างๆทั่วโลก (geographic distribution) และตามพืชอาศัย (Host range) และแบ่งตามคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม CBCD-A (Citrus Bacterial Canker Disease – A) เป็นกลุ่มที่แพร่ระบาดมากที่สุดในเอเชีย แอฟริกา หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก และในอเมริกาใต้ เชื้อในกลุ่มนี้จัดเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้างที่สุด เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ที่พบระบาดในประเทศไทยเข้าทำลายพืชตระกูลส้มทุกชนิดที่ปลูก และสามารถแพร่ระบาดไปกับผลส้ม มะนาว และกิ่งพันธุ์ โดยเฉพาะกิ่งพันธุ์ถ้ามีโรคนี้ติดไป จะทำให้เกิดการระบาดไปยังต้นอื่นๆได้ ปัจจุบันได้มีการพยายามส่งออกผลส้มออกไปขายยังต่างประเทศ โดยเฉพาะส้มโอ ทำให้จำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคนี้นั้นจะไม่สามารถส่งผลส้มไปขายได้ เพราะเชื้อโรคนี้นี้เป็นเชื้อที่สำคัญทางกักกันพืช ในประเทศอเมริกา ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น มีการตรวจสอบการนำเข้าผลส้มหรือกิ่งพันธุ์ส้มอย่างเข้มงวด ในสวนที่ต้องการส่งออกผลผลิตส้มไปยังต่างประเทศไม่ว่าจะเป็นส้มโอ และส้มเขียวหวาน จำเป็นต้องมีการกำจัดโรคให้หมดไปและต้องตรวจแปลงไม่ให้มีโรคในแปลงปลูก วิธีการที่จะป้องกันกำจัดให้ได้ผลดีจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจหาเชื้ออย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ การวิธีการตรวจหาเชื้อที่ใช้โดยทั่วไปจะทำการแยกเชื้อและปลูกเชื้อกลับบนต้นอ่อนส้ม ให้ต้นอ่อนส้มแสดงอาการ ต้องใช้เวลาในการตรวจหาเชื้อ 14-21 วัน ซึ่งใช้เวลานานไม่ทันต่อสถานการณ์ บางครั้งต้นส้มอาจเกิดการระบาดของโรคไปแล้ว ถ้ามีวิธีการตรวจหาที่รวดเร็วจะทำให้แก้ไขหรือป้องกันกำจัดได้ทันสถานการณ์

Roberts และคณะ (1996) ได้รายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas fragariae* สาเหตุโรค angular leaf spot ของ สตอเบอร์รี่ โดยใช้ specific primer และ nested PCR พบว่า specific primer RST2 และ RST3 จากการ design primer จาก *hrp* gene สามารถตรวจหาเชื้อได้ในระดับ 10^4 - 10^5 cfu/ml ในขณะที่ใช้ วิธี nested PCR สามารถตรวจหาเชื้อได้ถึงระดับต่ำ เพียง 18 cell

Hartung และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* โดยวิธีเทคนิค PCR โดยใช้ fragment ขนาด 572 bp EcoRI จาก plasmid DNA ของ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* XC62 ที่เชื่อมต่อกับ pUC9 นำไปหาลำดับเบส และ design primer ได้ primer ขนาด 18 bp จำนวน 7 primer นำมาทดสอบโดยใช้เทคนิค PCR กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* และ เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ พบว่า มี 4 primer ที่สามารถเพิ่ม

ปริมาณได้กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* และไม่เพิ่มปริมาณในเชื้ออื่นๆ และพบว่า primer 2-3 สามารถ เพิ่มปริมาณได้กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* pathotype A Hartung และคณะ(1996) ได้ศึกษาการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว โดยใช้เทคนิค Immunocapture และ nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* โดยใช้ specific primer ในการเพิ่มปริมาณในส่วน of plasmid DNA ของเชื้อแบคทีเรีย PCR product ที่ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาโดยวิธี immunocapture โดยใช้ monoclonal antiserum ในการตรวจสอบพบว่า สามารถตรวจหาเชื้อในใบส้มได้ในปริมาณที่ต่ำได้ โดยมีประสิทธิภาพเพิ่มมากกว่าการใช้ nested PCR อย่างเดียวอยู่ถึง 100 เท่า

ณัฐริมา และคณะ (2548) ได้ศึกษาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยใช้คูไพรเมอร์ D1(GGCCTTGATCAAAAGAACCA) และ D2(TTGAAGTAGG GGACGGTTTA) ที่ออกแบบจาก pthA gene ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 และ GenBank accession number XCU28802 สามารถตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ ทั้งในระดับดีเอ็นเอ และเซลล์แขวนลอยของเชื้อโดยความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอ เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ตรวจได้คือ 100 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A

Mavrodieva และคณะ (2004) พัฒนาเทคนิค Real time PCR ในการตรวจสอบโรคแคงเกอร์ทุกสายพันธุ์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR โดยสามารถนำไปใช้เครื่อง RAPID machine ที่สามารถพบพาไปใช้ในแปลงปลูกได้ นำไปใช้ตรวจสอบโรคแคงเกอร์ในแปลงปลูกโดยสามารถตรวจสอบใบส้มที่เป็นโรคเพียงจุดแผลเล็กๆแผลเดียว โดยมีความไวในการตรวจจับความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* 10 CFU/แผล และเป็นกรรายงานผลครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ตั้งแต่ ปี 1912 ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำเอาเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีความปลอดภัยสูง ไม่ต้องใช้สารที่เป็นอันตราย สามารถแสดงผลได้ในเวลาอันรวดเร็ว มาปรับใช้ในการตรวจสอบ ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ลดการระบาดของโรคและสามารถหาทางป้องกันกำจัดได้ทันถ่วงที และสามารถนำไปปรับใช้ในงานกักกันพืชต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้แช่แข็งชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน ทรายกลางต้นไม้ ปุ๋ย
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

1. ออกแบบ **specific primer** โดยใช้ primer design software ชื่อ Primer3 จาก *pthA* gene family ได้แก่ *pthA* gene (Gene Bank accession U28802) *apl1* (AB021363) *apl2* (AB021364) *apl3* (AB021365) *pthA1*, *pthA2*, *pthA3*, *pthA4* (Gene Bank accession AE008925) จำนวน 1 คู่สาย นำไปสังเคราะห์ primer จากหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ โดยมี primer 2/3 ที่ Hartung *et.al* (1993) รายงานว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ เพื่อเปรียบเทียบกับ primer ที่ออกแบบไว้

2. การแยก **genomic DNA** ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูบฆ่าเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียให้เติมหนึ่งลูบ ละลาย ใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อ

นาที่ นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ที่ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัด ปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. **ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR** โดยการหา T_m ที่เหมาะสม ของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมใน การทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

4. **ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR** ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นการทดสอบ primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้ สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA และเซลล์ของ เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ ที่ 10^8 cfu/ml การทดสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อแคแองเกอร์ (sensitivity) ของ primer เป็นการทดสอบ primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของเชื้อ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโต กรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้น 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

5. **ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จาก ตัวอย่างโรคแคแองเกอร์** ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคแองเกอร์ของส้มโอจากแปลงเกษตรกรใน อ.เวียงแก่น จ. เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัดแผลตัวอย่างโรค โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm. นำตัวอย่างใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *Xanthomonas* (SX media) โดยนำตัวอย่างโรคแคแองเกอร์แต่ละตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตรไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°C นาน 72 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR ดำเนินการโดยได้ออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อ *pth A* gene ของ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้แก่ pth154R / pth154F: และ J-RTpth3/ J-RTpth4 และ J-Taqpht2b ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงพบว่า primer ที่สังเคราะห์มามีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* อยู่ในระหว่างการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR และทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคแคงเกอร์จากแปลงปลูก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR ดำเนินการโดยได้ออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* อยู่ในระหว่างการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR และทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคแคงเกอร์จากแปลงปลูก

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ ปิยะรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วิชัย โฆสิตรัตน์ และวงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครากเน่าของพืชตระกูลส้มโดยวิธี Polymerase Chain Reaction. วารสารโรคพืช ปีที่19 ฉบับที่1-2 หน้า 35-46.
- อำไพวรรณ ภราดรนุวัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, วิเชียร กำจายภัย, สุพัฒน์ อรรถธรรม และนิพนธ์ ทวีชัย, 2527 , โรคส้มในประเทศไทย. โรงพิมพ์ หจก. พันนี้พับลิชชิง , กรุงเทพฯ. 126 หน้า
- Cubero, J. and J.M. Graham. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1257-1264.
- Gabriel, D.W. 1999.. The *Xanthomonas* avr/pth gene family. Pages 39-55 in: *Plant-Microbe Interactions*, vol. 4. G. Stacey and N.T. Keen, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Hartung, J. S., Daniel, J. F. and Pruvost, O. P .1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Appl Environ Microbiol* ;59:1143-8
- Hartung, J. S., Pruvost, O. P ,Villemot I.,and Alvarez, A. 1996. Rapid and colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* p.v. *citri* by immunocapture and nested – polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 86:95-101.
- Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology* 94:61-68.
- Schoulties , C.B. , E.L. Civerolo , Miller , R.E. Stall , C. J. Krass , S.R. Poc and S.P. Oucharmo. 1987. Citrus canker in Florida. *Plant Dis.* 71: 388 – 395.
- Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H., and Gabriel, D. W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* 81:802-809.