

Les infections à *Campylobacter* en France, 2002-2003

Sources : Centre national de référence et laboratoires correspondants

Synthèse réalisée par Anne Gallay (1), Valérie Prouzet-Mauléon (2), Francis Mégraud (2)

(1) Institut de veille sanitaire - (2) Centre national de référence des *Campylobacter* et *Helicobacter*, Laboratoire de bactériologie, CHU Pellegrin, Bordeaux

Mots clés : *Campylobacter*, épidémiologie, résistance aux antibiotiques, infection à *Campylobacter*

Courriel : a.gallay@invs.sante.fr ; francis.megraud@chu-bordeaux.fr

Les points essentiels

La naissance d'un réseau de surveillance des infections à *Campylobacter* communautaires : 3 532 souches analysées entre 2001 et 2003.

Le taux d'isolement des souches très largement sous-estimé, ne représente qu'une faible partie des infections à *Campylobacter* confirmées microbiologiquement :

- en 2003 : 3,4 / 100 000 personnes année
- élevé (14,3 / 100 000) chez les enfants âgés de moins de 5 ans par rapport aux autres tranches d'âge.

L'espèce *C. jejuni* est majoritaire : *C. jejuni* représente 76 % des souches, *C. coli* 17 % et *C. fetus* 5 % (dont 63 % ont été isolées dans le sang).

La résistance aux antibiotiques est stable avec une résistance à l'ampicilline (41 %) et aux quinolones (28,5 %) qui reste élevée.

Afin d'améliorer la surveillance des infections à *Campylobacter*, il est recommandé que :

- lors d'une prescription de coproculture devant une diarrhée présumée infectieuse, le praticien précise systématiquement « coproculture standard avec recherche de *Campylobacter* »,
- les laboratoires d'analyse de biologie médicale recherchent *Campylobacter* systématiquement dans les selles et participent au système de surveillance en envoyant leurs isollements au CNR.

1. Objectifs, modalités et qualités du système de surveillance

Objectifs

Les objectifs de la surveillance réalisée par le Centre national de référence (CNR) sont de documenter les caractéristiques épidémiologiques des infections à *Campylobacter* survenant chez l'homme, de suivre les évolutions temporelles et spatiales en termes d'incidence, de décrire les espèces de *Campylobacter* en cause, de détecter les cas groupés et de surveiller la résistance aux antibiotiques.

Définition des cas

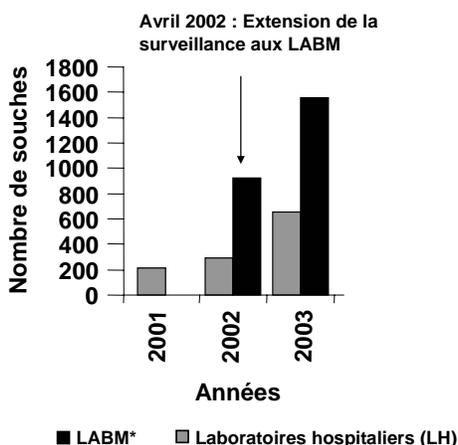
Un cas d'infection à *Campylobacter* est défini par l'isolement d'une souche de *Campylobacter* dans un prélèvement biologique (selles, sang, etc.) chez une personne résidant en France. Aucune information sur les signes cliniques n'est recueillie, les cas peuvent être des malades ou des porteurs sains.

Modalités

Entre 1986 et mars 2002, la surveillance des infections à *Campylobacter* était basée sur un réseau de laboratoires hospitaliers (LH), généraux et universitaires, répartis sur le territoire national (1). En avril 2002, la surveillance a été étendue aux laboratoires d'analyse de biologie médicale (LABM) encore appelés laboratoires de ville. Parmi les 3 444 LABM réalisant des examens bactériologiques en France, 1389 LABM, participant déjà à la surveillance des salmonelloses, ont été sollicités. Il est demandé aux laboratoires participant à la surveillance de rechercher systématiquement les *Campylobacter* dans les coprocultures (2). Les laboratoires envoient volontairement au CNR les souches isolées avec une fiche complétée avec des informations de nature épidémiologique (identifiant du laboratoire, département du laboratoire expéditeur, date de naissance, sexe, notion de voyage à l'étranger dans les 15 jours précédant le début de la maladie, notion de cas groupés) et sur l'échantillon biologique (date d'isolement, site de prélèvement). Pour toutes les souches reçues, le CNR réalise une caractérisation de l'espèce et des tests de sensibilité aux antibiotiques. Le CNR signale les cas groupés à l'InVS qui réalise une investigation afin d'identifier une éventuelle source commune. Parallèlement, la déclaration obligatoire (DO) des toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) permet de détecter et investiguer les cas groupés d'infection à *Campylobacter* d'origine alimentaire.

Cette extension du réseau aux LABM (taux de participation de 23 % : 325/1 389 LABM sollicités, soit un taux de participation de 9 % parmi 3 444 LABM réalisant des examens bactériologiques) a donc permis d'améliorer l'exhaustivité et la représentativité du système depuis avril 2002. Par ailleurs, le réseau de laboratoires hospitaliers qui fonctionne depuis 1986 s'est enrichi de nouveaux laboratoires en 2002 (taux de participation de 100 % : 80/80 LH sollicités, soit un taux de participation de 20 % parmi les 409 LH réalisant des examens bactériologiques) (Figure 1).

Figure 1 – Répartition du nombre de souches de *Campylobacter* selon l'année et le type de laboratoires, France 1986 – 2003.



* Laboratoire d'Analyse de Biologie Médicale (laboratoires de ville)

Les données présentées ici correspondent aux données recueillies entre le 1^{er} janvier 2002 et le 31 décembre 2003.

Qualités

Jusqu'en mars 2002, le système de surveillance basé sur un réseau de laboratoires hospitaliers n'était pas représentatif de la situation globale de l'infection à *Campylobacter* car un nombre important des cas correspondait à des malades hospitaliers. Depuis avril 2002, parmi les 1 389 LABM sollicités pour la surveillance des infections à *Campylobacter*, 325 laboratoires répartis sur 90 départements ont envoyé des souches au CNR (aucune souche n'a été envoyée par les laboratoires de 7 départements, dont Corse du Sud et Haute-Corse).

Campylobacter est une bactérie fragile, son isolement nécessite des conditions atmosphériques particulières (milieu appauvri en oxygène) et requiert une pratique diagnostique précise et régulière des laboratoires. Ces caractéristiques sont à l'origine d'un sous diagnostic du nombre de souches de *Campylobacter* isolées. De plus, une proportion non négligeable des souches (9%) n'est pas viable lorsqu'elle arrive au CNR et ne donne pas de subculture. Le système encore récent, ne permet pas de connaître les tendances des évolutions temporelles et spatiales, mais permet de décrire certaines caractéristiques des infections à *Campylobacter* survenant dans la communauté.

Les taux d'isolement pour 100 000 personnes année ont été calculés pour l'année 2003 (seule année complète pour les deux types de laboratoire LABM et LH) avec les données redressées du dernier recensement de la population française fait en 2001. Ces taux d'isollements calculés à partir des cas confirmés par les laboratoires participant à la surveillance ne reflètent pas l'incidence des infections à *Campylobacter* (confirmées et non confirmées) survenant en France.

2. Principales caractéristiques épidémiologiques

Les résultats présentés concernent 3 558 souches répertoriés au CNR dont 2 503 provenaient des LABM et 1 055 des LH. Le CNR a pu étudier 3 148 souches.

Le taux d'isolement des souches, calculé à partir du nombre de souches isolées en 2003 était de 3,4 / 100 000 personnes année. Le taux d'isolement était plus élevée (14,3 / 100 000) chez les enfants âgés de moins de 6 ans.

Répartition par âge

Trente et un pour cent des souches étaient isolées chez des enfants âgés de moins de 6 ans. Les personnes âgées (> 65 ans) représentaient respectivement 21,2 % et 10,6 % des souches isolées par les LH et les LABM (Tableau 1).

Le nombre de souches isolées chez les nourrissons de moins de 1 an représentait 6 % du nombre total de souches. Chez les nourrissons âgés de 3 mois ou moins, 66,7 % des souches provenaient des LH. La tendance s'inversait pour les nourrissons âgés de 4 à 11 mois, 82,3 % des isollements provenaient des LABM.

Tableau 1 - Distribution des souches selon les types de laboratoires (ville/hôpital) et les classes d'âge, France 2002 – 2003

Classes d'âge (ans)	Laboratoires hospitaliers		Laboratoires de ville	
	n	%	n	%
0 – 5	365	35,7	740	30,8
6 – 10	96	9,4	205	8,5
11 – 15	38	3,7	114	4,7
16 – 20	33	3,2	151	6,3
21 – 25	33	3,2	158	6,6
26 – 30	27	2,6	122	5,0
31 – 35	25	2,4	114	4,7
36 – 40	25	2,4	98	4,8
41 – 45	24	2,3	107	4,4
46 – 50	26	2,5	98	4,0
51 – 55	29	2,8	101	4,2
56 – 60	37	4,6	63	2,6
61 – 65	46	2,5	74	3,0
> 65	217	21,2	256	10,6
Total	781	100,0	2 635	100,0

Répartition par sexe

Excepté parmi les personnes âgées de 21 à 35 ans et de plus de 65 ans, la proportion d'isolements des *Campylobacter* chez les hommes était supérieure à celle des femmes (Figure 2). Le taux d'isolement annuel des *Campylobacter* était plus élevé chez les hommes (3,8 / 100 000) que chez les femmes (2,8 / 100 000).

Répartition par mois

Une recrudescence saisonnière des isolements de *Campylobacter* a été notée pendant la période estivale. Cette saisonnalité était surtout marquée pour l'espèce *C. jejuni*. La saisonnalité peu marquée pour *C. coli* pouvait être la conséquence d'un faible nombre de souches isolées (Figure 3).

Cas groupés

Signalés par le CNR

Des cas groupés ont été signalés au CNR 75 fois (3,9 %) parmi les 1 912 (53,7 %) cas renseignés. La majorité des foyers n'excédait pas 2 cas et n'a pas été investiguée.

Déclarés par le système de la DO des Tiac

Parmi les 1 657 foyers de toxi-infections alimentaires (521 en 2001, 597 en 2002 et 539 en 2003) détectés par le système de la déclaration obligatoire, 17 (1 %) foyers étaient liés à une contamination par *Campylobacter* (8 en 2001, 4 en 2002 et 5 en 2003). *Campylobacter* a été confirmé par coproculture pour 14 foyers et suspecté à l'aide d'un algorithme étiologique pour trois foyers. L'espèce a pu être caractérisée pour 5 foyers parmi les 14 confirmés (4 *C. jejuni* et 1 *C. coli*). Dix foyers (71,0 %) sont survenus en collectivité (écoles, restaurants commerciaux, instituts médico-sociaux) et 7 étaient des foyers familiaux. Parmi les 225 malades identifiés, 149 (66,0 %) étaient survenus dans 3 collectivités. Treize malades (6,0 %) ont été hospitalisés, aucun décès n'a été signalé. Parmi les aliments incriminés, la volaille (principalement le poulet) était fortement suspectée dans 6 foyers, les produits laitiers dans 4 foyers et du poisson dans un foyer. Pour 6 foyers, l'origine alimentaire était inconnue. *Campylobacter* n'a été isolé dans aucun aliment.

Voyage à l'étranger

L'information sur un voyage à l'étranger dans les quinze jours précédents la date de début des symptômes était renseignée pour 787 cas (22,1 %), parmi lesquels 107 personnes (13,6 %) avaient répondu positivement. Les destinations les plus fréquentes étaient l'Afrique du Nord (27,0 %) et l'Afrique subsaharienne (27,0 %).

Répartition des différentes espèces de Campylobacters et sites de prélèvement

L'espèce *C. jejuni* (75,9 %) était la plus fréquente suivie de *C. coli* (17,0 %) et *C. fetus* (5,4 %). Parmi les souches de *C. fetus*, 58,0 % étaient isolées chez les malades hospitalisés et 63,3 % dans les hémocultures (Tableau 2). Les personnes infectées par *C. fetus* étaient plus âgées (médiane d'âge : 71 ans) que les personnes infectées par *C. jejuni* (médiane d'âge : 19 ans) ou par *C. coli* (médiane d'âge : 32 ans).

L'immense majorité des souches (92,1 %) a été isolée dans les selles, seules 5,8 % ont été isolées d'hémoculture (Tableau 2). La proportion d'isolements provenant du sang ne variait pas selon le sexe, mais variait selon l'âge. Les personnes ayant une hémoculture positive à Campylobacter étaient plus âgées (médiane d'âge : 67 ans) que les personnes pour lesquelles le Campylobacter avait été isolé dans les selles (médiane d'âge : 21 ans).

Tableau 2 - Répartition des espèces de Campylobacter et bactéries apparentées identifiées au CNR par type de prélèvement, France, 2002 – 2003

Espèces	Selles	Hémocultures	Autre prélèvements	Inconnu	Total
<i>C. jejuni</i>	2 320	66	5	21	2 412 (76,6 %)
<i>C. coli</i>	528	7		8	543 (17,2 %)
<i>C. fetus</i>	38	88	10	6	142 (4,5 %)
<i>A. butzleri</i>	24	1	1	0	26 (0,8 %)
<i>C. lari</i>	8	3			11 (0,3 %)
<i>C. upsaliensis</i>	4				4 (0,1 %)
<i>C. hyointestinalis</i>	2				2 (< 0,1%)
<i>H. pullorum</i>	4			1	5 (0,1%)
<i>H. cinaedi</i>		1			1 (< 0,1%)
<i>H. canadensis</i>	1				1 (< 0,1%)
Total	2 929 (93,0 %)	167 (5,3 %)	16 (0,5 %)	34 (1,0 %)	3 148

A : *Arcobacter* ; H : *Helicobacter*

Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques ne montrait pas de différence majeure par rapport aux données obtenues à partir des LH entre 1986 et 2002 (3).

La résistance à l'érythromycine était toujours basse (3,3 %), la résistance à l'ampicilline élevée (41 %) et la résistance à la gentamicine inexistante (Tableau 3). Une augmentation a été notée pour la résistance aux tétracyclines qui était de 32,7 %, contre 12,6 % dans l'étude précédente (3). Toutefois, cette augmentation pourrait en partie être liée à l'utilisation de disques à la tétracycline dans l'étude précédente plutôt qu'à la doxycycline actuellement. Ce qui expliquerait que certaines souches aient une sensibilité intermédiaire ou soient résistantes à la doxycycline alors qu'elles seraient sensibles à la tétracycline. Cependant, cette augmentation de la résistance à la tétracycline pourrait aussi être réelle en raison de la consommation accrue de cette classe d'antibiotiques dans les élevages.

La résistance aux quinolones semblait s'être stabilisée. Pour l'acide nalidixique, elle était de 27,2% pour les souches isolées par les LABM et 31,5 % pour les souches isolées par les LH, contre 29 % pour les LH dans la période 1986-2002 (3). La résistance à la ciprofloxacine est légèrement inférieure : 25,8 % pour les LABM et 26,7 % pour les LH.

La résistance à l'acide nalidixique et à la doxycycline était supérieure chez les malades ayant voyagé à l'étranger dans les quinze jours précédents le début des symptômes (respectivement 38,0 % vs 26,5 % et 32,0 % vs 27,0 %). Le phénomène inverse était observé pour la résistance à l'ampicilline qui était supérieure chez les malades n'ayant pas voyagé à l'étranger dans les quinze jours précédents le début des symptômes (41,0 % vs 26,0 %).

Tableau 3 - Test de sensibilité des Campylobacters aux antibiotiques (% de résistance), France 2001* – 2003

	Total (% résistance)		<i>C. jejuni</i> (% résistance)		<i>C. coli</i> (% résistance)		<i>C. fetus</i> (% résistance)	
	LABM	LH	LABM	LH	LABM	LH	LABM	LH
Erythromycine	2,9	4,1	1,2	1,6	6,8	8,0	0	1,5
Doxycycline	33,7	30,3	31,4	22,9	44,3	49,3	11,4	11,4
Ampicilline	40,0	42,6	41,1	46,5	35,2	44,8	11,4	13,9
Acide nalidixique	27,2	31,5	25,2	28,5	33,2	43,4		
Gentamicine	Pas de résistance observée							

* Les données des tests de la sensibilité aux antibiotiques sont présentées pour les souches reçues au CNR entre le 01/01/2001 et le 31/12/2003.

LABM : Laboratoires de ville ; LH : Laboratoires hospitaliers

3. Perspectives et recommandations

Le système de surveillance des infections à *Campylobacter* survenant en ville est récent. On observe des similarités avec d'autres pays développés, comme la saisonnalité avec un pic pendant les mois chauds, une incidence plus élevée chez les enfants, une fréquence plus importante de l'espèce *C. jejuni* et une résistance élevée aux quinolones (4). Cependant, il existe certaines différences, notamment dans la fréquence des infections chez les hommes jeunes qui n'est pas supérieure à celle des femmes jeunes, dans le taux de résistance à l'ampicilline (64 % au Pays de Galles, 40 % en France vs 23 % en Allemagne, 17 % en Finlande) et dans la fréquence de l'espèce *C. coli* (17 % en France, 11 % en Belgique vs 5 % aux Pays-Bas et < 1% aux Etats Unis) (5).

Les méthodes utilisées pour caractériser l'espèce varient entre pays et entre laboratoires dans un même pays (6). Contrairement à d'autres pathogènes, les méthodes phénotypiques ne sont pas assez discriminantes pour la caractérisation des *Campylobacter*. Des méthodes de génotypie ont été développées, plus discriminantes que les méthodes phénotypiques, mais ce sont des techniques lourdes, coûteuses ne pouvant être réalisées en routine (N McCarthy, Oxford University, communication orale, mars 2004). La fréquence d'isolement de *C. coli* plus importante en France pourrait être attribuée à une meilleure identification des *Campylobacter* au niveau de l'espèce avec l'utilisation à la fois de méthodes phénotypiques et génotypiques par le CNR, et une vérification des résultats discordants (marge d'erreur < à 1% des souches). Dans certains pays, les *Campylobacter* ne sont pas systématiquement identifiés au niveau de l'espèce et pourraient être abusivement étiquetés *C. jejuni* ou *C. spp.*, ce qui serait à l'origine d'une sous estimation des autres espèces. Par ailleurs, les grands élevages de porcs dont est dotée la France pourraient être à l'origine d'une contamination chez l'homme suite à la consommation de viande de porc contaminée par *C. coli* ou à la consommation de volailles contaminées par *C. coli* dans les élevages situés à proximité des élevages de porcs (région Bretagne).

Le système de surveillance ne permet pas de faire des estimations d'incidence en population générale. Cependant, l'étude morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire réalisée par l'InVS a permis à partir de plusieurs sources d'informations, de réaliser des estimations ponctuelles du nombre de cas de *Campylobacter* confirmés, du nombre de cas hospitalisés, du nombre de cas décédés et du nombre de cas d'origine alimentaire (7). Le système de surveillance en Mayenne (1998 à 2000) et l'enquête de Charente Maritime (1996) qui mesuraient directement l'incidence des cas confirmés d'infections à *Campylobacter* ont fourni les estimations les plus probables : une incidence annuelle estimée d'infections à *Campylobacter* confirmées respectivement de 27 et 37 pour 100 000 habitants. Les estimations nationales étaient calculées en appliquant l'incidence obtenue dans chacun des deux départements à la population française. Ainsi la fourchette plausible se situe entre 16 000 et 22 000 cas d'infections à *Campylobacter* confirmées microbiologiquement par an en France. En appliquant la proportion d'infections d'origine alimentaire estimée aux Etats-Unis (80 %), le nombre d'infections confirmées à *Campylobacter* d'origine alimentaire a été estimé entre 13 000 et 18 000 par an.

Cependant ces incidences sont très probablement sous-estimées pour plusieurs raisons. Tous les laboratoires n'ont pas participé à la surveillance en Mayenne ou à l'étude en Charente Maritime. Les estimations obtenues à partir de ces 2 incidences régionales ne prennent pas en compte d'éventuelles variations géographiques d'incidence. Une étude chez les voyageurs suédois a montré que le risque d'avoir une infection diagnostiquée à *Campylobacter* dans les jours qui suivent un séjour en France était plus élevé qu'après un voyage dans d'autres pays européens comme par exemple au Royaume Uni où l'incidence des infections à *Campylobacter* est élevée (105 cas / 10⁵) (8). Par ailleurs, une étude française montre que seul un tiers des laboratoires recherche systématiquement les *Campylobacter* dans les selles (6,9). Plusieurs raisons peuvent expliquer cela. La recherche de *Campylobacter* est laissée au libre arbitre du microbiologiste, sauf si elle est spécifiquement prescrite par le médecin, contrairement aux salmonelles et shigelles qui sont recherchées systématiquement dans toutes les coprocultures

standards. La recherche de *Campylobacter* dans les selles est lourde et coûteuse sans que cela entraîne une majoration de la cotation forfaitaire de la coproculture.

Et pourtant les *Campylobacters* devraient être systématiquement recherchés dans les coprocultures étant donné leur implication fréquente dans les diarrhées aiguës survenant dans les pays développés. Ainsi les sociétés françaises de microbiologie, de gastroentérologie et de médecine générale recommandent que lors d'une prescription de coproculture devant une diarrhée présumée infectieuse, le praticien précise systématiquement « coproculture standard avec recherche de *Campylobacter* » (10). La prévalence des infections à *Campylobacter* parmi les syndromes de Guillain-Barré varie de 17 à 80 % selon les données de la littérature. Devant la survenue d'un syndrome de Guillain-Barré, la recherche de *Campylobacter* dans les selles devrait aussi être systématique.

Afin que le système de surveillance permette de répondre aux objectifs épidémiologiques, le nombre de laboratoires participant devrait augmenter et une attention particulière devrait être portée à la qualité des informations.

L'augmentation de la participation des laboratoires, par leur sollicitation régulière et un retour d'informations sous la forme d'un bulletin annuel, assurera une meilleure exhaustivité et représentativité des infections à *Campylobacter*. Par ailleurs, les laboratoires devraient être incités à rechercher en routine *Campylobacter* dans les selles lorsqu'une coproculture est demandée et à participer au système de surveillance en envoyant les souches isolées au CNR avec la fiche de recueil d'informations. A cette fin, il est nécessaire que le CNR poursuive la recherche pour l'amélioration des techniques diagnostiques de *Campylobacter* et l'harmonisation de leur utilisation dans les laboratoires.

Pour permettre au système de surveillance de jouer son rôle d'alerte, d'identifier des populations ou situations à risque, la qualité des informations qui sont recueillies est déterminante, la notion de cas groupés et de voyage à l'étranger devrait être notamment mieux renseignée. Les laboratoires doivent signaler à la Ddass les cas groupés d'infections à *Campylobacter* faisant suspecter une TIAC (maladies à déclaration obligatoire). Par ailleurs, les souches isolées dans un contexte de cas groupés devraient être systématiquement envoyées au CNR pour l'investigation épidémiologique et moléculaire de ces cas.

Une étude cas-témoin est en cours afin d'identifier les facteurs de risque d'acquisition des infections à *Campylobacter* communautaires survenant en France.

Remerciements

Les auteurs remercient les laboratoires d'analyse de biologie médicale (LABM) privés et les laboratoires hospitaliers qui ont participé à la surveillance en envoyant les souches et les fiches de recueil d'information au CNR des *Campylobacters* et *Hélicobacters*.

4. Références

1. Mégraud F, Les infections à *Campylobacter* en France (1986-2000), Centre National de Référence des *Campylobacter* et *Hélicobacter*. Rapport InVS ; Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000, p. 133-35.
2. Gallay A, Mégraud F. Mise en place d'un système de surveillance des infections à *Campylobacter* en France. *Revue Française des Laboratoires*, juin/juillet 2003, N° 354.
3. Mégraud F, Prouzet-Mauléon V. Evolution de la résistance des *Campylobacters* aux antibiotiques en France (1986 – 2002). *BEH* 2002;32-33:156-8.
4. Nachamkin I, Blaser MJ *Campylobacter*. 2nd Edition. ASM Press, Washington D.C. 2000 (545 p).
5. Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranet S et al. *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis* 2004;10(10):1863-7.
6. Takkinen J., Ammon A., Robstad O., Breuer T. & the *Campylobacter* Working Group*. European Survey on *Campylobacter* surveillance and diagnosis 2001. *Eurosurv* 2003 ; 8(11) :207-213.
7. Vaillant V, de Valk H, Baron E. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. Institut de veille sanitaire, rapport mars 2004; 189 p.
8. Ekdahl K, Giesecke J. Travellers returning to Sweden as sentinels for comparative disease incidence in other European countries, *campylobacter* and *giardia* infection as examples. *Eurosurv* 2004;9(9):3-4.
9. Gallay A, Simon F, Mégraud F. Surveillance of human *Campylobacter* infections in France. *Eurosurv* 2003; 8(11):213-8.
10. Société française de microbiologie, société française de gastroentérologie et société française de médecine générale. Recommandations pour la pratique clinique sur les indications des examens de selles chez l'adulte. *Bull Soc Fr Microbiol* 2003;18(4):287-94.