جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوم ـ شماره چهارم ـ زمستان ۸۷

بررسی ارزش کشت خلط در محیط MODS در تشخیص سل ریوی

دکتر زهره امین‌زاده[۱*]، دکتر فاطمه فلاح[۲**]، دکتر بنفشه منافیان[***]، دکتر پروانه بقایی[۳****]
[*]دانشیار بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[**]دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[***]دستیار بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[****]پزشک عمومی، بیمارستان مسیح دانشوری، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف

انتقال بیماری سل تا شناسایی و درمان بیماران مبتلا به سل ریوی اسمیر مثبت خلط ادامه دارد. کشت خلط روش تشخیصی استاندارد سل ریه است که حساس‌تر از اسمیر خلط می‌باشد. نیاز به ابزارهای جدید تشخیصی جهت شناسایی سریع‌تر مایکوباکتریوم سلی محسوس است. این مطالعه جهت تعیین ارزش تشخیصی کشت MODS (Microscopic-Observation Drug-Susceptibility) در سل ریوی و مقایسه آن با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون و کشت لوین‌اشتاین خلط انجام گرفت.

روش بررسی

روش تحقیق مقطعی از نوع تشخیصی و تکنیک آن مشاهده‌ای– مصاحبه‌ای با روش نمونه‌گیری متوالی بود. از هر بیمار مشکوک به سل ریوی یک نمونه خلط اخذ و بخشی از هر نمونه برای رنگ آمیزی زیل‌نلسون، کشت در محیط لوین‌اشتاین و کشت MODS استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری جهت تعیین شیوع، حساسیت، ویژگی و میزان اخباری مثبت و منفی MODS در برابر روش‌های استاندارد، انجام گرفت.

یافته‌ها

۱۰۰ بیمار (۴۸ مرد، ۵۲ زن) با میانگین سنی ۲۱/۸۳±۵۲/۹ بررسی شدند که ۴۰٪ رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون مثبت، ۳۰٪ کشت مثبت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در لوین‌اشتاین و ۴۷٪ کشت مثبت در MODS داشتند. حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و منفی MODS در مقایسه با زیل‌نلسون به ترتیب ۸۲/۵٪، ۷۷٪، ۷۰٪ و ۸۶٪ و در مقایسه با لوین‌اشتاین به ترتیب ۸۶٪، ۷۰٪، ۵۵٪ و ۹۲٪ بود. زمان مثبت شدن MODS و لوین‌اشتاین ۱۰–۸ روز و ۴–۳ هفته بود.

نتیجه‌گیری

مثبت شدن سریع MODS و نیز ارزش اخباری منفی ۹۲٪ آن در مقابل لوین‌اشتاین نشان می‌دهد که بررسی نمونه خلط به روش MODS روش تشخیصی ساده و سریع سل ریه می‌باشد.

کلید واژه‌ها: سل؛ کشت، زیل‌نلسون؛ لوین‌اشتاین؛ سل ریوی.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛
تلفن: ۵۵۴۱۱۷۱۷–۲۱–۹۸+ آدرس پست الکترونیکی: zohrehaminzadeh@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۷/۹/۱۸

[۱]مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری
[۲] مرکز تحقیقات عفونی اطفال بیمارستان کودکان مفید
[۳] مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

۱/۷ میلیون انسان در سال از بیماری سل می‌میرند (۱). انتقال بیماری سل تا شناسایی و درمان بیماران مبتلا به سل ریوی اسمیر مثبت خلط ادامه دارد (۲). سل مقاوم به درمان MDR (Multi Drug Resistant) میزان مرگ و میر و شکست درمان را افزایش داده است (۲). سازمان جهانی بهداشت در بیماران علامت‌دار انجام آزمایش میکروسکوپی خلط با روش رنگ‌آمیزی اسیدفاست را جهت بیماریابی تشخیص سل ریوی در سه نوبت (نوبت اول در روز مراجعه بیمار، نوبت دوم نمونه خلط صبح روز بعد Overnight و نمونه سوم در صبح روز دوم مراجعه) توصیه می‌نماید (۳،۴). روش اسید فاست می‌تواند بیمارانی که از نظر اپیدمیولوژی در انتقال عفونت به اطرافیان نقش دارند شناسایی نموده و ویژگی بسیار بالایی دارد. ولی وجود مشکلاتی نظیر نیاز به تجهیزات و پرسنل آموزش دیده و نیز حداقل ۱۵ دقیقه زمان صرف شده جهت هر اسلاید قبل از گزارش پاسخ منفی آن از محدودیت‌های این روش تشخیصی است (۶،۵) از روش‌های تشخیصی دیگر در تشخیص سل ریه در کشورمان کشت خلط از نظر مایکوباکتریوم توبرکولوزیس است که Gold Standard تشخیص سل و حساس‌تر از روش اسمیر خلط می‌باشد زیرا قادر است ۱۰۰-۱۰ مایکوباکتریایی زنده را در هر میلی‌لیتر نمونه خلط کشت نموده (۴) و حساسیتی بین ۸۱٪ (۴) و ۸۴٪ (۷) و ویژگی ۹۸/۵٪ (۴) و ۱۰۰٪ (۷) دارد. شناخت سل مقاوم به درمان با استفاده از متدهای کشت جهت بررسی داروهای حساس و مقاوم بسیار مشکل بوده و خطاهای آزمایشگاهی مشکلاتی را در شناسایی رده‌های حساس و مقاوم ایجاد نموده است (۴،۸). بنابراین نیاز ابزارهای جدید تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا جهت شناسایی سریع‌تر مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و نیز حساسیت و مقاومت میکروارگانیسم محسوس بوده و مطالعاتی در مورد روش تشخیص Microscopic-Observation Drug-Susceptibility = MODS حساسیت، ویژگی آن و نیز امکان تشخیص سریع‌تر بیماری و نیز شناخت مقاومت میکروبی سل در کوتاه‌ترین زمان ممکن وجود دارد (۷) (۱۲-۹).

این مطالعه قدرت تشخیصی روش MODS را در تشخیص سل ریوی بیماران بررسی و حساسیت، ویژگی و میزان اخباری مثبت و منفی آن را در برابر روش‌های استاندارد رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون خلط و کشت لوین‌اشتاین خلط مشخص نموده است.

روش بررسی

روش تحقیق توصیفی از نوع تشخیصی (Cross Sectional-Diagnostic) و تکنیک انجام آن مشاهده‌ای– مصاحبه‌ای بود. نمونه‌گیری به صورت متوالی و بر اساس امکانات تیم تحقیق شامل ۱۰۰ بیمار مشکوک به سل ریوی بستری در بیمارستان مسیح دانشوری تهران که برای ورود به طرح اعلام آمادگی نموده بودند، انجام گرفت. بعد از کسب شرح حال از بیماران، در صورت شک ابتلا به سل ریوی طبق معیارهای بالینی و بر اساس قضاوت متخصص بیماری‌های عفونی گرافی قفسه صدری برای ایشان درخواست شده و در صورتی که طبق قضاوت رادیولوژیست تغییرات آن هم توجیه‌کننده وجود بیماری سل ریوی بود بیمار به عنوان مشکوک به سل ریوی تلقی گردید و وارد این طرح شده و اطلاعات بیمار ثبت گردیده است. از بیماران فوق یک نمونه خلط به آزمایشگاه ارسال شد تا طبق روش استاندارد با استفاده از سدیم هیدروکسید N استیل L سیتئین آلودگی‌زدایی گردد. بخشی از هر نمونه برای رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون جهت تشخیص اولیه استفاده گردید، بخشی به محیط کشت لوین‌اشتاین جانسون تلقیح و قسمتی هم برای بررسی با روش MODS استفاده شد. برای کشت در محیط لوین‌اشتاین جانسون ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده را تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس دو بار در هفته از روز ۷ تا ۶۰ به منظور مشاهده رشد کلنی‌ها کلیه نمونه‌ها بررسی شد. در روش MODS به پلیت‌های ۲۴ خانه کشت بافت، محیط مایع بروک 7H9 (Broth Base; Becton Dickinson: 5.9 g per L)، OADC (Oxalic Acid, Albumin Dextrose, Catalase)، PANTA (Polymyxin, Amphotaicin B, Nalidixic Acid,Trimethoprim, Azlocillin) اضافه و ۷۲۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده به هر خانه اضافه شد برای هر نمونه ۱۲ خانه منظور شده و کنترل‌های منفی و مثبت نیز لحاظ شدند. بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد روزانه کلیه نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری Invert بررسی گردیدند. نمونه‌های مثبت با مشاهده تشکیل Cord که مشخصه رشد باسیل سل است شناسایی شدند. با افزودن آنتی‌بیوتیک‌های ایزونیازید، ریفامپین، اتامبوتول، پیرازینامید به ترتیب با غلظت‌های ۰/۲، ۲، ۷/۵، ۲/۵ و ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به خانه‌های پلیت در روش

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

MODS به طور همزمان مقاومت دارویی باکتری نیز بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS و روش‌های آماری جهت تعیین شیوع، حساسیت، ویژگی و میزان اخباری مثبت و منفی MODS در برابر روش‌های استاندارد، انجام گرفت.

یافته‌ها

۱۰۰ بیمار (۴۸ مرد، ۵۲ زن) با میانگین سنی ۲۱/۸۳±۵۲/۹ سال (حداقل ۱۵ و حداکثر ۸۷ سال) بررسی شدند. ۴۸٪ از بیماران در گروه سنی ۲۰ تا ۶۰ ساله، ۴۳٪ مسن‌تر از ۶۰ سال و ۹٪ کمتر از ۲۰ سال بودند. ۹۶٪ بیماران سرفه، ۸۹٪ خلط، ۲۵٪ همو‌پتزی، ۸۵٪ کاهش وزن، ۷۵٪ تب و ۷۴٪ تعریق داشتند. تظاهرات رادیوگرافی قفسه سینه بیماران شامل: درگیری قله ریه ۸۸٪، درگیری لوب میانی و تحتانی ریه ۷۹٪، درگیری دو طرفه پارانشیم ریه ۶۴٪، کاویتی ۵۵٪، نمای ارزنی ۷٪، لنفادنوپاتی ناف ریه ۴٪ بود. در ۴۰٪ از بیماران رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون خلط مثبت بود، ۳۰٪ از بیماران کشت مثبت از نظر مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در محیط لوین‌اشتاین و ۴۷٪ از بیماران کشت مثبت در محیط MODS داشتند. مقاومت به ایزونیازید در ۶۲٪، اتامبوتول در ۶۱٪، ریفامپین ۶۰٪ و پیرازینامید ۵۵٪ گزارش شد. حساسیت، اختصاصیت، NPV (Negative Predictive Value)، PPV (Positive Predictive Value) و کارایی کشت MODS در مقایسه با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون و کشت خلط در محیط لوین‌اشتاین به ترتیب در جدول شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.

کشت‌های مثبت به روش MODS در مدت ۱۰-۸ روز به دست آمد و نمونه‌های کشت در محیط لوین‌اشتاین در مدت ۳-۴ هفته مثبت شدند.

جدول شماره ۱: مقایسه نتیجه کشت MODS با آزمایش استاندارد (رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون) در خلط بیماران مشکوک به سل ریوی

نتیجه رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون / نتیجه کشت MODS	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۳۳	۱۴	۴۷
منفی	۷	۴۶	۵۳
جمع	۴۰	۶۰	۱۰۰

۸۲/۵٪= حساسیت،۷۷٪=اختصاصیت، ۷۰٪=PPV، NPV=۸۶٪ ، کارایی=۷۹٪

جدول شماره۲: مقایسه نتیجه کشت MODS با آزمایش استاندارد (کشت خلط در محیط لوین‌اشتاین) بیماران مشکوک به سل ریوی

نتیجه در محیط لوین‌اشتاین / نتیجه کشت MODS)	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۲۶	۲۱	۴۷
منفی	۴	۴۹	۵۳
جمع	۳۰	۷۰	۱۰۰

۸۶٪ = حساسیت، ۷۰٪ = اختصاصیت، ۵۵٪ = PPV، NPV=۹۲٪ ، کارایی = ۷۵٪

بحث

در تحقیق حاضر، میزان مثبت شدن رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون ۴۰٪، کشت مثبت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در محیط لوین‌اشتاین ۳۰٪ و کشت مثبت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در محیط MODS، ۴۷٪ بود. Moore در بررسی ۵۷۷۱ نمونه ۹۴٪ کشت مثبت MODS و ۸۷٪ کشت مثبت لوین‌اشتاین گزارش کرد (۹). Arias و همکاران در یک مطالعه وسیع و چند مرکزی درکشورهای با شیوع بالای سل میزان مثبت شدن رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون، کشت در محیط لوین‌اشتاین و کشت به روش MODS را به ترتیب ۳۵/۹٪، ۴۴/۴٪ و ۴۱/۵٪ گزارش کرده‌اند (۱۳). میزان مثبت شدن کشت به دو روش لوین‌اشتاین و MODS در این دو مطالعه با مطالعه حاضر مشابه است. ولی درتحقیق Oberhelman که در کودکان ۱۲ ساله و کوچک‌تر با علایم سل ریوی و با بررسی نمونه ترشحات معده، آسپیراسیون ترشحات نازوفارنکس و مدفوع انجام شد در ۸۶/۸٪ کشت MODS مثبت و در ۵۵/۳٪ کشت لوین‌اشتاین مثبت گزارش گردید که میزان مثبت MODS مطالعه وی خیلی بیشتر از کشت لوین‌اشتاین بود (۱۲). در این مطالعه، کشت مثبت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به روش MODS در عرض ۱۰ –۸ روز به دست آمد. کشت مثبت MODS در تحقیق Moore (۹) در ۸ روز و در مطالعه Arias (۱۳) در مدت ۲ هفته و در تحقیق Menqatto (۱۴) در کمتر از ۱۰ روز گزارش شده است. در تحقیق حاضر، حساسیت کشت MODS در مقایسه با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون ۸۲/۵٪ و اختصاصیت آن ۷۷٪ بود. در تحقیق Arias (۱۳) حساسیت ۹۴٪ و اختصاصیت ۹۰٪ برای کشت MODS در مقایسه با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون و در مطالعه Moore (۱۰) اختصاصیت ۹۹/۹٪ گزارش شده که بیشتر از نتایج مطالعه حاضر بوده است. هم‌چنین مطالعه اخیر، ارزش اخباری مثبت ۷۰٪ برای کشت MODS در مقایسه با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون خلط نشان می‌دهد. به عبارت دیگر اگر کشت MODS در یک بیمار مشکوک به سل ریوی مثبت شود با احتمال ۷۰٪ رنگ‌آمیزی خلط زیل‌نلسون آن بیمار مثبت خواهد شد. ارزش اخباری مثبت کشت MODS در مقایسه با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون در مطالعه Arias (۱۳)، ۹۴٪ و در تحقیق Moore (۱۰)، ۹۹٪ بوده که از مطالعه حاضر بیشتر می‌باشد. در این تحقیق، ارزش اخباری منفی کشت MODS در برابر رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون خلط ۸۶٪ بود. یعنی اگر در بیمار مشکوک به سل ریوی، کشت MODS منفی باشد با احتمال ۸۶٪ رنگ‌آمیزی اسمیر خلط وی منفی خواهد شد که با نتیجه مطالعه Arias (۱۳) که ارزش اخباری منفی را ۹۰٪ گزارش کرده مشابه است. در نهایت کارایی کشت MODS در مقایسه با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون خلط در مطالعه حاضر ۷۹٪ بوده که کمتر از تحقیق Arias (۱۳) با نتیجه ۸۵٪ می‌باشد. شاید تعداد نمونه‌های مطالعه ایشان اختلاف فوق را توجیه نماید. در این تحقیق، حساسیت و اختصاصیت کشت MODS در مقایسه با کشت لوین‌اشتاین به ترتیب ۸۶٪ و ۷۰٪ است که کمتر از مطالب Arias (۱۳) با حساسیت ۹۶/۵٪ و اختصاصیت ۹۲/۶٪ است. هم‌چنین ارزش اخباری مثبت و منفی کشت MODS در مقابل لوین‌اشتاین به ترتیب ۵۵٪ و ۹۲٪ است یعنی اگر نتیجه کشت MODS در بیمار مشکوک به سل ریوی مثبت شود با احتمال ۵۵٪ کشت لوین‌اشتاین وی نیز مثبت خواهد شد و اگر کشت MODS وی منفی شود با احتمال ۹۲٪ کشت لوین‌اشتاین هم منفی خواهد بود. در تحقیق Arias (۱۳) ارزش اخباری مثبت MODS ۹۰٪ و ارزش اخباری منفی آن ۹۷/۵٪ می‌باشد که بیشتر از نتایج مطالعه حاضر است. در تحقیق حاضر، کارایی کشت MODS در مقایسه با کشت لوین‌اشتاین ۷۵٪ بوده که از مطالعه Arias (۱۳) با نتیجه ۹۴٪ کمتر است. شاید علت اختلاف یافته‌های مطالعه حاضر با تحقیق ایشان وسعت و چند مرکزی بودن Arias (۱۳) در کشورهای با شیوع بالای سل باشد.

بررسی وضعیت مقاومت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به ایزونیازید و ریفامپین با استفاده از کشت MODS در مطالعات Moore (۹) و Mentgatto (۱۴) و Park (۱۵) به عنوان تست دقیق و سریع‌تر از روش مرجع و نیز با حساسیت خوب بیش از ۹۰٪ تا ۱۰۰٪ نشان داده شده است. در تحقیق حاضر در مدت کوتاهی روی نمونه‌های مثبت کشت MODS مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین و اتامبوتول و پیرازینامید مشخص گردید که می‌تواند در شناسایی موارد سل مقاوم به درمان (MDR) بسیار با اهمیت و کاربردی باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به کوتاه بودن زمان در مثبت شدن کشت MODS و نیز ارزش اخباری منفی ۹۲٪ آن در مقابل کشت لوین‌اشتاین به نظر می‌رسد که بررسی نمونه خلط بیماران مشکوک به سل ریوی به روش کشت MODS روشی ساده و سریع در تشخیص سل ریوی است. هم‌چنین روش MODS در شناخت مقاومت و حساسیت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس نسبت به ایزونیازید، ریفامپین، پیرازینامید، اتامبوتول در مدت زمان کوتاه، می‌تواند کمک‌کننده باشد.

References:

1. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva: world Health Organization; 2006:1-242. Available from: http://www.who.Int/tb/publications/global/report/2006/en/index.html. Accessed: September 15, 2006.
2. Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, et al. Standard Short-Course Chemotherapy for Drug-Resistant Tuberculosis: Treatment Outcomes in 6 Countries. JAMA 2000;283:2537-45.
3. Enarson DA, Reider HL, Arnadottir T, Trebucq A. Tuberculosis Guide for Low Income Countries. 4th ed. IUATLD; 1996.
4. API Consensus Expert Committee. API TB Consensus Guidelines 2006: Management of Pulmonary Tuberculosis, Extra-Pulmonary Tuberculosis and Tuberculosis in Special Situations. J Assoc Physicians India 2006;54:219-34.
5. Narain R, Subba-Roa MS, Chandrasekhar P. Microscopy Positive and Microscopy Negative Cases of Pulmonary Tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1971;103:761-773.
6. Rouillon A, Perdrizer S, Parrot R. Transmission of Tubercle Bacilli: The Effect of Chemotherapy. Tubercle 1976;57:275-299.
7. Moore DA, Evans C. Gilman RH. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. N Engl J Med 2006;355:1539-50.
8. Burman WJ. Stone BL, Reves RR, et al. The Incidence of False-Positive Cultures for Mycobacterium Tuberculosis. Am j Respir Crit Care Med 1997;155(1):321-6.
9. Moore DA, Mendoza D, Gilman RH. Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay, A Rapid, Reliable Diagnostic Test for Multidrug-Tesistant Tuberculosis Suitable for Use in Resource-Poor Settings. J Clin Microbiol 2004;42(10):4432-7.
10. Moore DA, Caviedes L, Coronel J. Infrefquent MODS TB Culture Cross-Contamination in a High Burden Resource-Poor Setting. Diagn Microbial Infec Dis 2006;56(1):35- 43.
11. Park WG, Bishai WR, Chaisson TE, Dorman SE. Performance of the Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay in Drug Susceptibility Testing for Mycobacteriam Tuberculosis. J Clin Microbiol 2002;40(12):4750-2.
12. Oberhelman RA, Soto-Castellares G, Caviedes L. Improved Recovery of Mycobacterium Tuberculosis from Children Using the Microscopic Observation Drug Susceptibility Method. Pediatrics 2006;118(1):100-6.
13. Arias M, Mello FCQ, Pavo´n A, Marsico AG, Alvarado-Ga´ lvez C, Rosales S. Clinical Evaluation of the Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for Detection of Tuberculosis. CID 2007;44:674-680.
14. Mengatto L, Chiani Y, Imaz MS. Evaluation of Rapid Alternative Methods for Drug Susceptibility Testing in Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 Aug;101(5):535-42.
15. Park WG, Bishai WR, Chaisson RE, Dorman SE. Performance of the Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay in Drug Susceptibility Testing for Mycobacterium Tuberculosis. J Clin Microbiol 2002;40(12):4750-20.