



گذار به روش‌های مدرن در کنترل کیفیت واکسن‌های فلج اطفال با تأکید بر اصول 3Rs

زهرا برادران سید^۱، فاطمه اثنی عشری^{۲*}

۱- عضو هیئت علمی (استادیار)، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- عضو هیات علمی (استادیار)، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

*نویسنده مسئول: فاطمه اثنی عشری fesna2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۶-۰۹-۱۴۰۴ تاریخ پذیرش: ۲۵-۱۱-۱۴۰۴

چکیده

اصول سه گانه 3Rs شامل جایگزینی (Replacement)، کاهش (Reduction) و اصلاح (Refinement)، چارچوبی اخلاقی و علمی برای کاهش وابستگی به آزمون‌های حیوانی در کنترل کیفیت واکسن‌ها هستند. در حوزه واکسن فلج اطفال، آزمون‌های استاندارد مرسوم مانند تست نوروویرولانس در میمون (Monkey Neurovirulence Test: MNVT) و آزمون مپرک (Mutant Analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage; MAPREC) سال‌ها به‌عنوان شاخص‌های ایمنی، بی‌ضرری و یا ثبات ژنتیکی به کار رفته‌اند، اما این روش‌ها زمان‌بر، پرهزینه و یا محدود به ارزیابی بخش‌های خاصی از ژنوم ویروس هستند. گزارش‌های اخیر سازمان جهانی بهداشت، به‌ویژه مطالعات مشترک NIBSC-WHO (BS/2019.2359 و BS/2022.2438) نشان داده‌اند که نسل جدید فناوری‌های توالی‌یابی (Next-Generation Sequencing: NGS) و توالی‌یابی با توان بالا (High-Throughput Sequencing: HTS)، امکان اندازه‌گیری دقیق و تکرارپذیر جهش‌های شاخص در ویروس‌های واکسنی را دارند و می‌توانند جایگزین قابل اعتماد آزمون‌های اختصاصی رایج شوند. این فناوری‌ها قادر به تحلیل کل ژنوم ویروس هستند و روند کنترل کیفیت واکسن‌های خوراکی و تزریقی را از نظر دقت، سرعت و کارآمدی ارتقا می‌دهند. کارگاه تخصصی WHO در جاکارتا (۲۰۲۳) و آخرین کنفرانس جهانی WHO در سوئیس برای بررسی وضعیت فلج اطفال (اکتبر ۲۰۲۵) نیز بر ضرورت حرکت کشورها به سمت استانداردسازی HTS به‌عنوان بخشی از نظام نوین کنترل کیفیت واکسن‌های فلج اطفال تأکید کرده است. این مقاله با برشمردن اصلاحات WHO در راستای 3Rs، به چالش‌های پیش رو شامل نیاز به زیرساخت، آموزش تخصصی و استانداردسازی روش‌ها می‌پردازد و پیشنهادهایی برای پیاده‌سازی عملی این روش‌ها در کشور ارائه می‌کند.

واژگان کلیدی

اصول 3Rs، واکسن فلج اطفال، کنترل کیفیت، توالی‌یابی با نسل جدید روش‌ها (NGS)، تست‌های حیوانی

بیان مساله و اهمیت موضوع

واکسن‌های فلج اطفال شامل تزریقی (Inactivated Oral Polio Vaccine: IPV) و واکسن خوراکی (Polio Vaccine: OPV)، از دهه ۵۰ میلادی به عنوان یکی از بزرگ‌ترین دستاوردهای علمی بشر در پیشگیری از بیماری‌های ویروسی شناخته می‌شوند. سازمان جهانی بهداشت (WHO) از سال ۱۹۸۸ با راه‌اندازی سامانه جهانی ریشه‌کنی فلج اطفال (Global Polio Eradication Initiative: GPEI)، موفق شده است بروز این بیماری را بیش از ۹۹ درصد در سطح جهان کاهش دهد (۱). کنترل کیفیت این واکسن‌ها برای دهه‌ها بر اساس استانداردهای اختصاصی WHO و با استفاده از آزمون‌های حیوانی، به‌ویژه آزمون نوروویرولانسی در میمون (MNVT) و استفاده از موش تراریخته (-Transgenic mouse neurovirus) (lence test: TgmNVT) انجام می‌شده است (۲).

پیشرفت‌های علمی اخیر، از جمله توسعه واکسن‌های nOPV (novel-OPV) که ریسک بازگشت به سویه‌های وحشی را کاهش می‌دهند، نیاز به روش‌های دقیق‌تر، سریع‌تر و غیرحیوانی را اجتناب‌ناپذیر کرده است. سازمان‌هایی مانند NC3Rs (The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) و WHO با ترویج اصول سه‌گانه 3Rs شامل جایگزینی (Replacement)، کاهش (Reduction) و اصلاح (Refinement) زمینه استفاده از روش‌های جایگزین را در سنجش کیفیت واکسن‌ها فراهم کرده‌اند (۲، ۳، ۴).

به این منظور، سازمان جهانی بهداشت کارگاه‌های تخصصی را برای ترویج و تسهیل اجرای استانداردهای بین‌المللی جدید برگزار می‌کند. از جمله در کارگاه تخصصی اجرای استانداردهای بین‌المللی برای کنترل کیفیت واکسن‌های فلج اطفال در جاکارتا (اکتبر ۲۰۲۳)، بر لزوم مشارکت فعال کلیه کشورهای تولیدکننده واکسن در پروژه‌های استانداردسازی بین‌المللی تأکید گردید (۲). همچنین، در کنفرانس مؤسسه‌ی PATH (سپتامبر ۲۰۲۵) و نیز آخرین کنفرانس جهانی WHO در سوئیس برای بررسی وضعیت فلج اطفال (اکتبر ۲۰۲۵) نیز نقش NGS در تهیه‌ی واکسن‌های فلج اطفال، مورد توجه قرار گرفته است.

بهره‌گیری از نسل جدید فناوری‌های توالی‌یابی (NGS) و توالی‌یابی با توان بالا (HTS) که به‌صورت هم‌زمان و دقیق تغییرات ژنتیکی را شناسایی می‌کنند، به‌عنوان جایگزین آزمون‌های حیوانی در حال گسترش است. گزارشات WHO از مطالعاتی که به‌طور مشترک در چند مرکز تولیدکننده واکسن انجام شده، نشان داده که این روش‌ها می‌توانند به‌طور موثر برای کنترل کیفیت مولکولی واکسن‌های فلج

اطفال به کار روند (۳، ۴). اجرای این رویکردهای مدرن، مصرف حیوانات و هزینه‌های آزمایشگاهی را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد (۱، ۲، ۵).

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی از سال ۱۳۵۱ در تولید واکسن فلج اطفال نقش اساسی داشته و کشور در دهه گذشته به‌عنوان منطقه عاری از فلج اطفال شناخته شده است. با این حال، بهره‌گیری از روش‌های نوین مانند NGS نیازمند سرمایه‌گذاری در زیرساخت‌های فناورانه، آموزش نیروی انسانی متخصص و همکاری با نهادهای بین‌المللی است تا کنترل کیفی واکسن‌های انسانی و دامپزشکی مطابق با استانداردهای جدید جهانی انجام گیرد.

دستاوردها

اصول سه‌گانه‌ی 3Rs (جایگزینی، کاهش و اصلاح) بیش از پنجاه سال است که به‌عنوان پایه‌ی اخلاقی در استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در تحقیقات علمی شناخته می‌شوند. این اصول نخستین‌بار در سال ۱۹۵۹ توسط Russell و Burch معرفی شدند و از دهه‌ی ۱۹۸۰ توسط نهادهای بین‌المللی از جمله NIBSC (The National Institute for Biological Standards and Control) در سیاست‌های کنترل کیفیت واکسن‌ها نهادینه شدند. اجرای این اصول در کنترل کیفی واکسن‌های انسانی و دامپزشکی با هدف کاهش وابستگی به تست‌های حیوانی، افزایش دقت نتایج و کاهش هزینه‌ها انجام می‌شود. در زمینه‌ی واکسن فلج اطفال، اصول 3Rs باعث تحولی بنیادین در ارزیابی ایمنی و پایداری سویه‌های واکسن شده‌اند. این موضوع در مجموعه گزارش‌های رسمی سازمان جهانی بهداشت (WHO Technical Report Series Nos. 993, 1024, 1045) مستند شده است (۲، ۳، ۴).

این سازمان در راستای ترویج اصول 3Rs و به دنبال پیشرفت‌های فناوری، بازنگری‌های اساسی در راهنماهای کنترل کیفیت واکسن‌های فلج اطفال انجام داده است. این بازنگری‌ها منجر به جایگزینی یا کاهش قابل توجه استفاده از آزمون‌های حیوانی و پذیرش روش‌های مولکولی مدرن شده است. بر اساس این بازنگری‌ها که در اسناد فنی WHO از جمله TRS 993، TRS 1024 و TRS 980 منعکس شده است، روش‌های متعددی به‌صورت رسمی جایگزین یا اصلاح شده‌اند. برای واکسن فلج اطفال غیرفعال (IPV)، استفاده از آزمون فعال‌سازی مونوسیت (Monocyte activation test: MAT) یا فاکتور C نوترکیب (rFC) برای آزمون‌های پیروژنیستی یا ردیابی اندوتوکسین، به‌تصویب رسیده است. از سوی دیگر، استفاده از الایزای D-Antigen جایگزین آزمون‌های توانمندی (Potency) درون‌تنی (In Vivo) مبتنی بر حیوان و آزمایش ایمنی‌زایی شده است. در ELISA D-Antigen از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای



در MAPREC عدم تغییر ویروس تخفیف حدت یافته‌ی واکسن SN₃ در فرآیند تولید، بررسی می‌شود. بدین ترتیب، نبود (Single Nucleotide Polymorphism) یا جهش‌های برگشتی تأیید می‌گردد (۲، ۸). همچنین انجام این آزمایش، مجوزی برای حذف آزمون سنجش مارکر حرارتی یا همان تست Reproductive Rct 40 (capacity at elevated temperature) است که برای تأیید کاهش توان تکثیر ویروس واکسن در دماهای بالا، مصرف می‌گردد (۸).

با وجود دقت مناسب MAPREC، این روش نیازمند استفاده از مواد فلورسنت و یا رادیواکتیو، مهارت فنی بالا و زمان‌بر است و تنها نواحی خاص و از پیش تعیین شده ژنوم را بررسی می‌کند. در مقابل، در HTS کل ژنوم ویروس با دقت و حساسیت بالا، توالی‌یابی شده و کلیه واریانت‌ها و جهش‌های موجود در جمعیت ویروسی، در هر نقطه از ژنوم، شناسایی و کمی‌سازی می‌شوند. مطالعات بین‌المللی نشان داده‌اند که برای ویروس تیپ-۳، اندازه‌گیری C-472 توسط NGS همبستگی بسیار بالایی با نتایج MAPREC دارد (Pearson r = 0.996). همچنین در مطالعه مشترک فاز دوم WHO برای تیپ‌های ۱ و ۲ نیز همبستگی‌های قوی گزارش شده است (تیپ-۱: $r=0.994$ و تیپ-۲: $r=0.999$). با این وجود، WHO توصیه کرده است که قالب آزمون‌ها، آستانه‌های اعتبار و SOP‌های مرتبط پیش از کاربرد گسترده‌تر، به صورت رسمی تعیین شوند. بر پایه‌ی این شواهد و نیز مطالعات مراکز همکار با سازمان جهانی بهداشت، کمیته کارشناسی

اندازه‌گیری مستقیم آنتی‌ژن D استفاده می‌شود. از دیگر اقدامات در راستای کاهش استفاده از حیوانات، در آزمون شناسایی عوامل خارجی مانند ویروس‌های متصل شونده به گلبول قرمز (Haemadsorbing)، استفاده از خون تنها یک گونه حیوانی، برای بررسی هر دو واکسن تزریقی و خوراکی فلج اطفال (OPV) قابل قبول است (۶، ۷). علاوه بر این، در راستای اصول 3Rs، جایگزینی آزمون‌های دیگر مانند تست شناسایی و عیارسنجی ذرات ویروسی در واکسن OPV با فناوری HTS، همچنین استفاده از NGS/HTS برای تشخیص ویروس‌های خارجی با جذب گلبول قرمز در هر دو نوع واکسن OPV و IPV پیشنهاد شده است. این پیشنهادات نشان‌دهنده حرکت جامع به سمت روش‌های مولکولی مدرن و کاهش وابستگی به آزمون‌های حیوانی در کنترل کیفیت واکسن‌های فلج اطفال است (جدول ۱). امکان‌سنجی جایگزینی MAPREC و MNVT با NGS در ادامه مورد بحث قرار گرفته است.

آزمون MAPREC و جایگزینی با NGS

علاوه بر آزمون نورویرولانسیس در میمون (MNVT) یا موش تراریخته‌ی (TgmNVT) که بیان‌کننده‌ی گیرنده‌ی انسانی CD155 است، سازمان جهانی بهداشت استفاده از آزمون مپرک (MAPREC) را برای تأیید ثبات ژنتیکی سویه‌های تخفیف حدت یافته در واکسن خوراکی فلج اطفال توصیه کرده است (۳، ۴، ۹). آزمون MAPREC بر پایه‌ی آنالیز جهش‌ها از طریق PCR و برش آنزیمی طراحی شده است و هدف آن اطمینان از عدم بازگشت ویروس واکسن به فرم بیماری‌زا است.

جدول ۱. بازنگری‌های پیشنهادی در راستای اجرای اصول 3Rs برای واکسن‌های فلج اطفال (۷).

تست در حیوان آزمایشگاهی	نوع واکسن	توضیح کاربرد	تست جایگزین	اصل مرتبط در 3Rs
MNVT	OPV/hOPV	ارزیابی بیماری‌زایی عصبی	NGS/HTS+ MAPREC	Replacement /Reduction
تست عوامل خارجی	OPV/IPV	تشخیص ویروس‌های خارجی با جذب گلبول قرمز (Haemadsorbing)، جهت تأیید مواد اولیه و محصول	NGS/HTS	Replacement
تست شناسایی و عیارسنجی	OPV	شناسایی و اندازه‌گیری مقدار هر یک از سه نوع ذره‌ی واکسنی ویروسی	HTS	Replacement

عملکرد NGS و کاربرد آن

نسل جدید فناوری توالی‌یابی (NGS) مبتنی بر انجام توالی‌یابی متعدد و موازی است که می‌تواند میزان همگنی و ناهمگنی را در نمونه‌هایی با توالی‌های ژنومی بسیار گسترده، با توان عملیاتی فوق‌العاده و سرعت بالا، گزارش و مشخص کند. این نوآوری عملکرد، آزمایش‌های تحقیقاتی و کیفیت مطالعات را در سطحی گسترده و بی‌سابقه، متحول ساخته است. فناوری NGS با اجرای میلیون‌ها توالی‌یابی موازی، امکان قرائت کل ژنوم و ویروس را با توان و تکرار بسیار بالا فراهم می‌کند. عبارت NGS به مجموعه‌ای متنوع از دستورالعمل‌های ابداع شده و فن‌آوری‌های کاربردی توسعه‌یافته بعد از روش سنگر (Sanger sequencing) اطلاق می‌شود که در دهه‌های اخیر، جهت تعیین توالی رشته‌های مولکول DNA و RNA، کاربرد داشته‌اند و بر اساس سه نوع از تبادلات زیست-شیمیایی، طراحی گردیده‌اند (تصویر شماره ۲). با روش سنگر بخشی از ژنوم به عنوان الگو خوانش می‌شود، ولی در NGS، کل ژنوم موجودی قابل بازخوانی و رمزگشایی می‌باشد (۳، ۴، ۱۰).

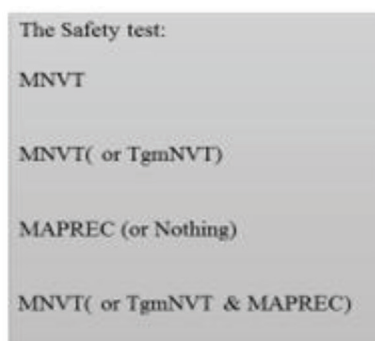
در هر دو روش، یک پلیمراز مولکول‌های الگو را با ترکیب نوکلئوتیدهای مرجع، یعنی بخشی از ژنوم (سنگر) یا کامل (NGS) کپی می‌کند. گسترش، مرتب‌سازی و تشخیص، مراحل مشترک در هر دو پروتکل هستند اما به ترتیب متفاوتی رخ می‌دهند. در NGS یک مرحله بازسازی وجود دارد که بازها را به شکل رنگ‌نشده و قابل گسترش تبدیل می‌کند (تصویر شماره ۳). NGS تحلیل دقیق و کمی کل جمعیت ویروسی را ممکن ساخته و امکان شناسایی واریانت‌های نادر (حتی با فراوانی کمتر از ۱ درصد) را در هر نقطه از ژنوم فراهم می‌آورد (۳، ۴). مکانیسم پایه در

استانداردسازی زیستی (Expert Committee on Biological Standardization: ECBS)، استفاده از نسل جدید فناوری‌های توالی‌یابی را به‌عنوان یک روش مولکولی جایگزین معتبر، برای آزمون MAPREC در کنترل کیفیت واکسن‌های خوراکی فلج اطفال در چارچوب اثبات ثبات فرآیند تولید (Consistency)، مورد تایید قرار داده است (۳، ۴، ۸).

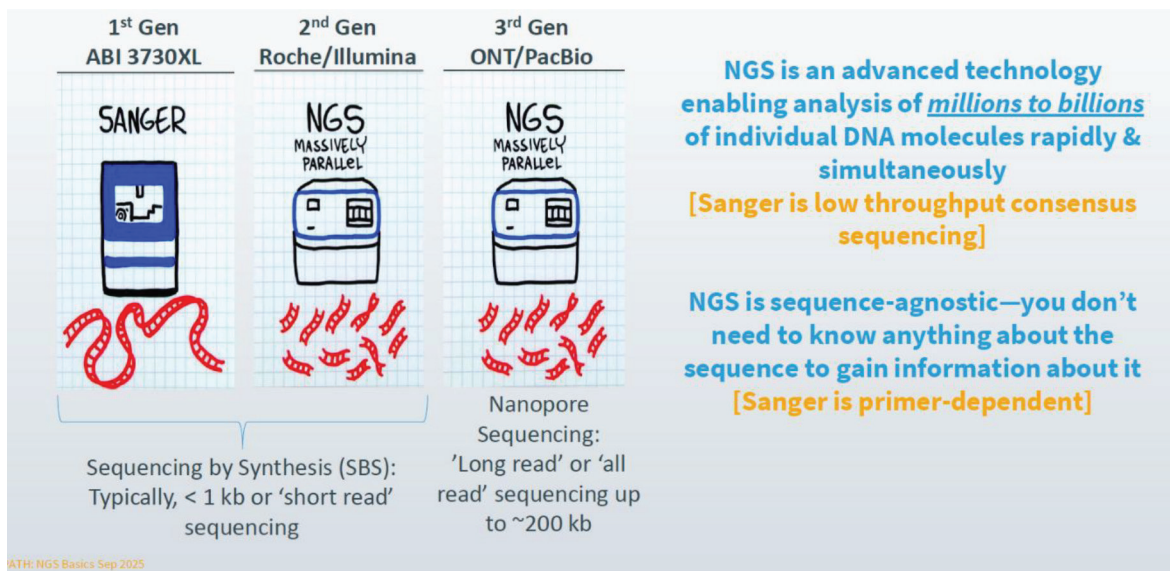
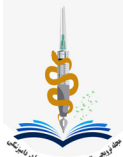
تست نوروویرولانسی در میمون (MNVT) و جایگزینی NGS با

تست نوروویرولانسی در میمون از دهه ۱۹۶۰ به عنوان آزمون استاندارد طلایی برای ارزیابی ایمنی واکسن‌های خوراکی فلج اطفال (OPV) به کار رفته است. این آزمون شامل تزریق داخل‌نخاعی ویروس واکسنی به میمون و بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک در بافت عصبی است. با این حال، این روش به دلیل تنوع بیولوژیک و ژنتیکی بین حیوانات، هزینه بسیار بالا، مدت زمان طولانی و نگرانی‌های اخلاقی مرتبط با استفاده از پریمات‌ها، با محدودیت‌های جدی مواجه است (۲).

در راهنماهای فنی جدید WHO، از NGS نه تنها به عنوان جایگزین MAPREC، بلکه به عنوان فناوری با پتانسیل جایگزینی برای MNVT نام برده شده است. رویکرد پیشنهادی بدین صورت است که پس از تایید ثبات فرآیند تولید توسط یک سازنده، می‌توان از تطابق پروفایل ژنومی کامل (Whole-genome SNP profile) هر سری جدید واکسن با پروفایل پیشین واکسن‌هایی که قبلاً با MNVT تایید شده‌اند، به عنوان معیاری برای تریخیص سری‌های جدید، بدون نیاز به تکرار MNVT، استفاده کرد (تصویر شماره ۱) (۲، ۳، ۴).



تصویر شماره ۱- فرایند جایگزینی NGS برای سنجش محصولات واکسنی فلج اطفال (۲، ۹).



تصویر شماره ۲- مقایسه توالی‌یابی در آزمایش‌های Sanger و NGS (PATH, NGS basics Sep. 2025) (۹).

کاربردهای گسترده‌تر

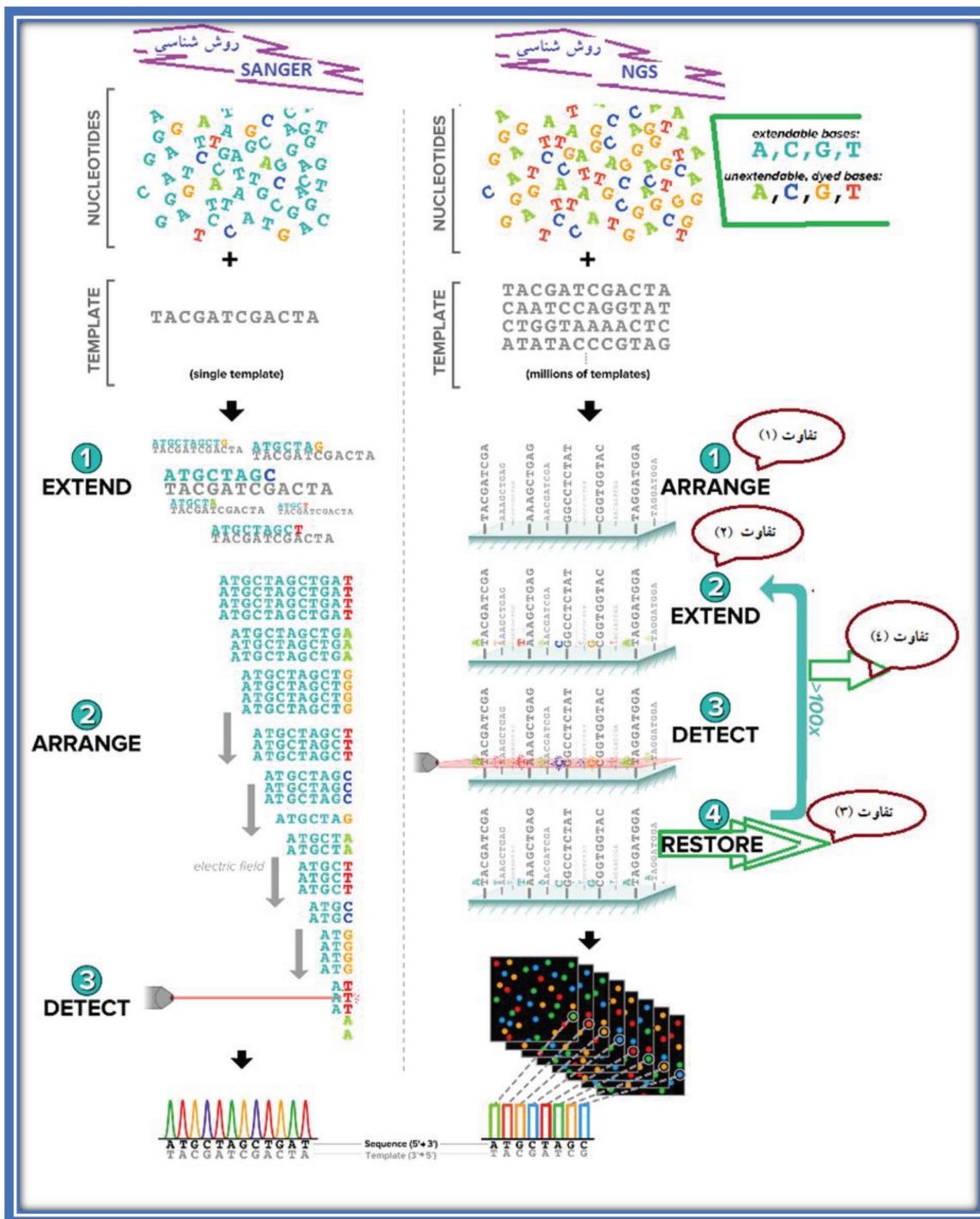
اصول 3Rs می‌توانند وابستگی به حیوانات را نه تنها در فرایند تولید و کنترل کیفی واکسن‌های انسانی بلکه در واکسن‌های دامپزشکی نیز کاهش دهند (۶). برای اجرای اصل جایگزینی، استفاده از مدل‌هایی نظیر انواع سلول‌ها و نیز کاربرد ابزاری شبیه‌سازی‌های کامپیوتری، از مواردی هستند که قابلیت لازم برای توسعه را دارا می‌باشند (جهت اطلاع از انواع روش‌ها مراجعه شود به <https://nc3rs.org.uk/our-portfolio/search>).

توصیه ترویجی

اصول 3Rs راهکاری اخلاقی، اقتصادی و پایدار برای تسریع ریشه‌کنی فلج اطفال هستند. برای پیاده‌سازی اصول 3Rs، برگزاری و شرکت در کارگاه‌های آموزشی WHO و شبکه همکار (اعضای GPEI) به منظور افزایش آگاهی تولیدکنندگان واکسن، آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت، نهادهای نظارتی و محققان بیولوژیک، قابل توصیه است. ایجاد کمیته مشترک با وزارت بهداشت و آزمایشگاه مرجع کشوری برای همسان‌سازی با استانداردهای WHO ضروری است. بهره‌مندی از سرمایه‌گذاری GPEI در تامین تجهیزات NGS، یا خرید خدمات توصیه می‌گردد. همچنین، همکاری با WHO و

پلتفرم‌های رایج NGS (مانند سیستم‌های Illumina) مبتنی بر «توالی‌یابی توسط سنتز یا ساخت» است که در آن توالی نوکلئوتیدی در حین سنتز رشته مکمل خوانده می‌شود (۹، ۱۰).

مزیت اصلی NGS در کنترل کیفیت واکسن فلج اطفال، توانایی آن در ارائه یک «پروفایل ژنومی کامل» از هر بچ واکسن است. این پروفایل نه تنها شامل واریانت‌های شناخته‌شده (مانند موقعیت ۴۷۲ در تیپ ۳) می‌باشد بلکه تمامی تغییرات احتمالی در سراسر ژنوم را نیز در بر می‌گیرد (۲، ۹). این ویژگی، NGS را به ابزاری ایده‌آل برای اثبات «ثبات فرآیند» در تولید تبدیل می‌کند، به طوری که تطابق پروفایل ژنومی بچ‌های جدید با پروفایل‌های مرجع آن مرکز، می‌تواند به عنوان معیار اصلی ترخیص محصول مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این حجم گسترده‌ای از اطلاعات ژنتیکی برای محصول، در هر مرحله از تولید به دست می‌آید که پیش‌بینی و بازخوردها را راحت‌تر، سریع‌تر و احتمالاً مطمئن‌تر می‌سازد. هرچند NGS می‌تواند واریانت‌های با فراوانی پایین را شناسایی کند، اما آستانه‌ی قابل اطمینان تابع پلتفرم و اعتبار کارآزمایی است و نیاز به سرورهای محاسباتی و چالش‌های کالیبراسیون، از جمله مسائل پیش‌رو است (۲، ۳، ۴).



تصویر شماره ۳- روند اجرای مراحل توالی یابی در آزمایش های Sanger و NGS (۱۰).



شبهه همکار از جمله مشارکت در طرح‌های بین‌المللی جهت اعتباربخشی روش‌ها ضروری است. آموزش نیروی انسانی متخصص در حوزه بیوانفورماتیک و گسترش بهره‌مندی از روش‌های مدرن در واکسن‌سازی به طور موکد توصیه می‌گردد.

فهرست منابع

1. WHO. Poliomyelitis 2025 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>].
2. WHO, editor World Health Organization. Meeting Report: WHO workshop on implementation of international standards for quality control of polio vaccines. Jakarta, 2023.
3. Report on the WHO collaborative study to investigate the utility of next generation sequencing (NGS) as a molecular test of virus stocks used in the manufacture of Type 1 and 2 Poliovirus vaccine (Oral), WHO/BS/2022.2438 (2022).
4. Martin J, Chumakov K, Hockley J, Wilton T, Crawl L, NGS-Study-Group, et al. Report on the WHO collaborative study to investigate the utility of next generation sequencing (NGS) as a molecular test of virus stocks used in the manufacture of Poliovirus vaccine (Oral).
5. Geneva: WHO; 2019. Contract No.: WHO/BS/2019.2359.
6. Lilley E, Isbrucker R, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals: Summary of NC3Rs final report to WHO Expert Committee for Biological Standardisation. Biologicals. 2025;89:101778.
7. Viviani L, Balks E, Beken S, Brady A-M, Clayton R, Cliquet F, et al. 3Rs implementation in veterinary vaccine batch-release testing: Current state-of-the-art and future opportunities. A webinar and workshop report. 2023;83:101695.
8. NC3Rs. Review of animal use requirements in WHO biologics guidelines – database of suggested guideline revisions. 2025.
9. WHO Expert Committee on Biological Standardization: seventy-sixth report. WHO Technical Report Series, TRS 1045 (2023).
10. PATH, editor Webinar: Applying next-generation sequencing for vaccine development and testing 2025.
11. Muzzey D, Evans EA, Lieber CJ. Understanding the basics of NGS: from mechanism to variant calling. 2015;3(4):158-65.