ORIGINAL ARTICLE

Molecular Detection of Clostridium Difficile in Patients with Diarrhea via LAMP Technique

Seyyede Farsin Hosseini[1],
Mohammad Amin Almasi[2],
Mohammad Taghi Kardi[3],
Sharare Moghim[4],
Vajihe Karbasizade[5]

[1] MSc in Microbiology, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, Isfahan, Iran
[2] MSc in Biotechnology, Zanjan, Iran
[3] MSc in Microbiology, Isfahan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, Isfahan, Iran

(Received October 2, 2013 ; Accepted June 21, 2014)

Abstract

Background and purpose: *Clostridium difficile* is an obligate anaerobic, gram positive bacillus. The purpose of this study was to develop and optimize Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for assessing the prevalence of *Clostridium difficile* infection in the samples of watery diarrhea.

Material and methods: This cross-sectional qualitative study was performed in 48 samples of watery diarrhea (fecal samples were obtained from 24 patients with nosocomial diarrhea and 24 patients with antibiotic-associated diarrhea). All samples were cultured in the specialized CDMN Agar medium. Six specific primers were applied for the LAMP Assay and the LAMP reaction was conducted under optimal conditions. Furthermore, sensitivity and specificity of LAMP were determined to detect *Clostridium difficile*.

Results: In this study, the optimized LAMP technique was determined to be 10 bacterium. In addition, LAMP technique showed a high specificity for detecting the bacteria. Among the patients with nosocomial diarrhea and antibiotic-associated diarrhea, 18.2% and11.5% were reported to be positive, respectively.

Conclusion: LAMP was found as an applicable, sensitive, and quick technique for detection of *Clostridium difficile*.

Keywords: Watery diarrhea, *Clostridium difficile*, LAMP technique

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(115): 36-42 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۵ مرداد سال ۱۳۹۳ (۴۲-۳۷)

تشخیص مولکولی کلستریدیوم دیفیسیل دربیماران مبتلا به اسهال با استفاده از روش تکثیر تک دمای حلقه ای

سیده فرسین حسینی[۱]
محمد امین الماسی[۲]
محمد تقی کاردی[۳]
شراره مقیم[۴]
وجیهه کرباسی زاده[۵]

چکیده

سابقه و هدف: *کلستریدیدم دیفیسیل* باسیل گرم مثبت، بی هوازی اجباری است. تشخیص دقیق وسریع یکی از مسائل مهم در کنترل عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* است. هدف از این پژوهش راه‌اندازی و بهینه‌سازی روش مولکولی تکثیر هم دمایی به واسطه حلقه (LAMP) برای ارزیابی شیوع عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه‌های اسهالی آبکی بیماران است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۴۸بیمار مبتلا به اسهال آبکی (۲۴ بیمار مبتلا به اسهال بیمارستانی، ۲۴ بیمار مبتلا به اسهال متعاقب مصرف آنتی‌بیوتیک) انجام شد. نمونه بیماران مبتلا به اسهال بر روی محیط اختصاصی CDMN آگار کشت داده شدند. ۶ پرایمر اختصاصی برای تکنیک LAMP به کار گرفته شد و واکنش LAMP تحت شرایط بهینه انجام شد. تشخیص حساسیت و ویژگی تکنیک LAMP از ویژگی بسیار بالایی برخوردار بوده که جهت تشخیص *کلستریدیوم دیفیسیل* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه حساسیت روش بهینه‌سازی شده LAMP، ۱۰ ذره باکتریایی بود. از ۲۴ بیمار مبتلا به اسهال بیمارستانی و ۲۴ بیمار مبتلا به اسهال متعاقب مصرف آنتی‌بیوتیک به ترتیب ۱۸/۲ درصد و ۱۱/۵ درصد به وسیله تکنیک LAMP مثبت گزارش شدند.

استنتاج: تکنیک LAMP روشی کاربردی، حساس و سریع در تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل می‌باشد.

واژه های کلیدی: تکنیک LAMP، اسهال آبکی، *کلستریدیوم دیفیسیل*

مقدمه

اسهال یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی است و یکی از معضلات بهداشتی اکثر جوامع به خصوص کشورهای جهان سوم را تشکیل داده است که در این میان اسهال وابسته به *کلستریدیوم دیفیسیل*، علت شایع اسهال بیمارستانی می‌باشد(۱). مرگ و میر ناشی از این بیماری را سالیانه ۱۰ میلیون نفر گزارش می‌کنند. تشخیص سریع عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه‌های بالینی، نقش به‌سزایی در کنترل بیماری دارد(۲). بر خلاف این‌که

مولف مسئول: سیده فرسین حسینی- اصفهان: دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی E-mail: hoseini.farsin@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲.کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، زنجان، ایران
۳.کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، اصفهان، ایران
۴. استادیار، گروه ویروس شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۵. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۷/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۹/۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۳/۳۱

اکثر روش‌های کشت بی‌هوازی و همچنین تست‌های سرولوژی، پیچیده وزمان بر بوده و فاقد حساسیت و ویژگی کافی می‌باشند(۴)، کشت بی‌هوازی کلستریدیوم دیفیسیل در محیط CDMN آگار از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار می‌باشد. در حال حاضر روش *cytotocity Assay* و *Enzyme Immune Assay* که نشان دهنده مستقیم توکسین کلستریدیوم دیفیسیل می‌باشند از روش‌های تشخیصی روتین در آزمایشگاه‌ها می‌باشند. با توجه به این که روش آنزیم ایمیون اسی (EIA) از تکنیک ساده‌ای برخوردار می‌باشد ولی حساسیت آن متفاوت بوده و حضور ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ پیکوگرم از توکسین جهت مثبت شدن این تست ضروری است. ارزیابی سیتوتوکسی سیتی که به آن ارزیابی کشت بافت نیز می‌گویند تست *Gold Standard* بوده که جهت تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل می‌باشد و زمان بر وهزینه بر است(۴،۳). در سال‌های اخیر براساس تکثیر اسیدنوکلئیک باکتری روش‌های مولکولی مختلفی پایه‌گذاری شدند که می‌توانند اسید نوکلئیک میکروارگانیزم را در فاصله زمانی کوتاه تکثیر کرده و نتیجه را اعلام کنند. رایج‌ترین روش مولکولی برای تشخیص کلستریدیوم دیفیسیل، PCR می‌باشد(۴)، اما لزوم تجهیزات و دستگاه‌های دقیق و استفاده از روش‌های پرزحمت برای تشخیص محصولات تکثیر شده از جمله عواملی هستند که استفاده از این روش را به عنوان تکنیکی روتین در مراکز تشخیصی محدود می‌کنند(۵،۶). در سال ۲۰۰۰، Notomi و همکارانش برای اولین بار تکنیک تکثیر هم دما به واسطه حلقه LAMP[1] را که از ویژگی، اختصاصیت وسرعت بسیار بالایی برخوردار است ابداع نمودند(۷). تکنیک تکثیر هم دما به واسطه حلقه LAMP روشی سریع، حساس و ساده برای تکثیر اسیدنوکلئیک می‌باشد که قادر است DNA هدف را تحت شرایط هم دما و با استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی تکثیر کند(۹،۸). استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی که ۸ توالی مجزا را روی توالی هدف شناسایی می‌کنند، ویژگی و حساسیت این تکنیک را افزایش می‌دهند. در واکنش LAMP، علاوه بر ۲ پرایمر داخلی (FIP ،BIP) و۲ پرایمر خارجی (F3،B3) که منطقه هدف را مشخص می‌کنند، می‌توان از یک جفت پرایمر اضافی تحت عنوان پرایمرهای ویژه حلقه (LB ،LF) نیز استفاده نمود تا بدین طریق حساسیت تکنیک افزایش یابد(۱۲-۱۰). برخلاف PCR، واکنش LAMP نیاز به ترموسایکلر ودناتوراسیون DNA الگو نداشته و با استفاده از خصوصیت جایگزین رشته‌ها (standard displacement) توسط DNA پلیمراز Bst انجام می‌شود. این واکنش قادر است کم‌تر از یک ساعت از یک کپیDNA، تعداد $۱۰^{۹}$ کپی تولید کند و محصولات تکثیری حاصل با چشم غیرمسلح و بدون نیاز به ژلالکتروفورز قابل مشاهده است.این روش با افزودن رنگ سایبرگرین ۰/۱ درصد و مشاهده در زیر نور UV در زمان کم‌تری قادر به شناسایی عامل می‌باشد(۱۴،۱۳).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۴۸ نمونه اسهال آبکی (۲۴ بیمارمبتلا به اسهال متعاقب مصرف آنتی‌بیوتیک مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی مهدیه اصفهان و ۲۴ بیمار مبتلا به اسهال بستری در بیمارستان‌الزهرا اصفهان) مورد بررسی قرار گرفتند که این نمونه بیماران مبتلا به اسهال بر روی محیط اختصاصی CDMN آگار کشت داده شدند. تمامی نمونه‌های اسهال آبکی پس از تلقیح در محیط مغذی CDMN به مدت ۳روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از شوک الکلی، به روش کشت خطی در محیط CDMN آگار کشت داده شدند و در شرایط بی‌هوازی اجباری به مدت ۲ روز انکوبه شدند. به دلیل این‌که CDMN محیط اختصاصی باکتری کلستریدیوم دیفیسیل است، نیازی به تست‌های افتراقی و اختصاصی دیگری جهت تشخیص این باکتری نمی‌باشد(۱۵).

1. Loopmediated isothermal amplification

استخراج DNA:

DNA باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* به‌وسیله کیت Ribo preb amplisens ،Russia (Cat: k2-9-et-100) از نمونه‌ها استخراج گردید.

پرایمرهای ویژه LAMP:

پرایمرهای مورد استفاده در واکنش LAMP،از مقاله Kato و همکاران در سال ۲۰۰۵براساس توالی ژنی tcdB (GenBank accession no.KC292192) استفاده شد (جدول شماره ۱) (۱۶).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش LAMP

FF3	GTATCAACTGCATTAGATGAAAC
BB3	CCAAAGATGAAGTAATGATTGC
FFIB	CTGCACCTAAACTTACACCATCTATCCTTCCTACATTATCTGAAGGATT
BBIP	GAGCTAAGTGAAACGAGTGACCCGCTGTTGTTAAATTTACTGCC
FLB	AATAGTTGCAATTATAGG
BLF	AGACAAGAAATAGAAGGCTAGG

مخلوط واکنش LAMP:

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر و شامل ۱میکرولیتر DNTP به غلظت ۱/۴ mM، ۸ میکرولیتر بتائین به غلظت ۰/۸ M، ۲/۵ میکرولیتر آنزیم Bst (New England Biolabs)، ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم به غلظت 1X حاوی Kcl (10Mm)، Tris-Hcl (20mM)، $Mgso_4$ (9mM)، $(NH_4)_2$ SO_4 (10mM)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمرهای F3 و B3 هر کدام به غلظت MP۲۰، ۲ میکرولیتر پرایمرهای FIP و BIP هر یک به غلظت ۲۰PM و ۱ میکرولیتر پرایمرهای لوپ LF و LB هر یک به غلظت ۲۰PM می‌باشد.

ارزیابی واکنش LAMP:

واکنش LAMP در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در هات بلاک و به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت، سپس به هر لوله نمونه مقدار ۱ مایکرولیتر از سایبرگرین ۰/۱ درصد اضافه گردید و در زیر نور UV مشاهده شد. لوله‌های مثبت به رنگ سبز و لوله‌های منفی به رنگ نارنجی خیلی کم رنگ دیده شدند.

تعیین حساسیت تست LAMP:

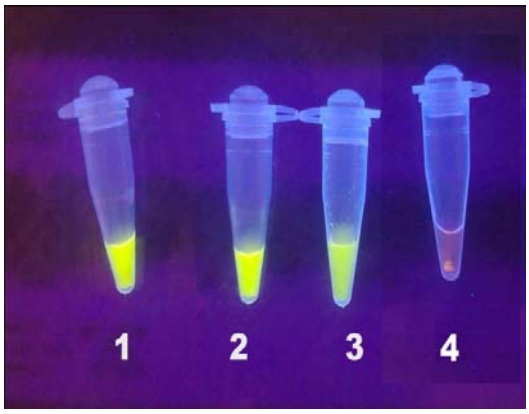
برای تعیین حساسیت تست LAMP، رقت‌های مختلف DNA باکتری از یک میلیون تا ۱۰ذره باکتری به روش رقیق‌سازی (Serial-Dilution) یا Kochs Method تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند.

تایید ویژگی تست LAMP:

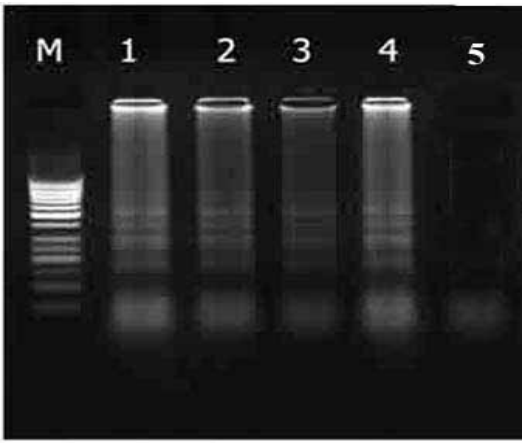
برای تایید ویژگی تکنیکLAMP، DNAهای *HCV*، *Clostridium histolyticum*، *Staphylococcus aureus*، *Klebsiellapneumonia*، ونمونه کنترل منفی بررسی شدند.

یافته ها

بعد از پایان واکنش به دنبال اضافه کردن سایبرگرین، لوله مثبت به رنگ سبز روشن ولوله منفی به رنگ نارنجی خیلی کم رنگ دیده شد (تصویر شماره ۱) و محصول واکنش LAMP به وسیله ژل آگاروز ۲ درصد مورد تایید قرار گرفت. با توجه به تست ویژگی، تکنیک LAMP در تشخیص باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* دارای ویژگی ۹۵/۶ درصد بوده است (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: تشخیص واکنش LAMP زیر نور UV: لوله ۱، ۲ و ۳ کنترل مثبت، لوله ۴ کنترل منفی.



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول LAMP روی ژل آگارز ۲ درصد
M: DNA سایز مارکر bp ۱۰۰، لاین ۱: کنترل مثبت، لاین ۲،۳،۴: نمونه های مثبت، لاین ۵: کنترل منفی

نتایج حاصل از LAMP بر روی نمونه‌های اسهال آبکی نشان داد که از مجموع ۲۴ نمونه از افراد بستری در بیمارستان (۱۸/۲ درصد) و از مجموع ۲۴ نمونه از افراد مبتلا به اسهال متعاقب مصرف آنتی بیوتیک مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی (۱۱/۵ درصد) مبتلا به عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* بودند. *حساسیت LAMP* در مقایسه باکشت (به عنوان استاندارد) در نمونه‌های بالینی ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۹۵/۶ درصد گزارش شد. ارزش اخباری مثبت و منفی LAMP به ترتیب ۹۵/۳ درصد و ۱۰۰درصد محاسبه گردید.

بحث

کلستریدیوم دیفیسیل یک باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی، اسپوردار وتولیدکننده توکسین است. *کلستریدیوم دیفیسیل* با ایجاد دو اگزوتوکسین، توکسین A (انتروتوکسین) وتوکسین B (سایتوتوکسین) موجب کولیت واسهال می‌شود. پاتوژن وعوامل میزبان نقش مهمی در اپیدمیولوژی *کلستریدیوم دیفیسیل* بازی می‌کنند(۱۷). با وجود این‌که در حال حاضر روش‌های تشخیص *کلستریدیوم دیفیسیل* پیشرفت‌های بسیاری داشته‌اند، ولی به دلیل معایب این روش‌ها در تشخیص عفونت، معیار مناسبی برای تشخیص عفونت به حساب نمی‌آیند.از این رو لازم است روش‌های مولکولی جایگزین روش‌های کشت و ایمونولوژیکی شوند(۱۸). طی سال‌های اخیر مطالعاتی در ارتباط با بررسی فراوانی عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* انجام شده است که از جمله این مطالعات می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: Gursoy و همکارانش در سال ۲۰۰۷ با روش کشت سلولی مشخص کردند که ۲۷/۷ درصد از مبتلایان به اسهال متعاقب مصرف آنتی‌بیوتیک و ۱۴ درصد افراد بستری در بیمارستان دچار عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* هستند(۱۹). در سالاریدز سال ۱۹۹۹ با کشت بی‌هوازی نمونه‌های مدفوع اسهال بیمارستانی مشخص کرد ۱۸ درصد افراد مورد مطالعه مبتلا به عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* بودند(۲۰). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ میلادی توسط Noren و همکارانش بر روی نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به کلستریدیوم دیفیسیل انجام شد، در مقایسه تکنیک LAMP با دو تکنیک کشت و سیتوتوکسین B، حساسیت و اختصاصیت تکنیک LAMP را ۹۸ درصد (ppv=92%،npv>99%) گزارش کردند و برحساسیت و اختصاصیت این تکنیک تاکید کردند(۲۱). Boyanton و همکارانش در سال ۲۰۱۲ پس از مقایسه تکنیک LAMP با Real time PCR و آنزیم ایمینو اسی از تکنیک LAMP، به عنوان یک آزمون سریع، دقیق، مقرون به صرفه با حساسیت ۹۵/۲ درصد (ppv=83.3%، npv=99.2%) گزارش کردند(۲۲). در مطالعه حاضر حساسیت LAMP، ۱۰۰ درصد (ppv=95.3%، npv=100%) محاسبه گردید. هم‌چنین مبتلایان به اسهال بیمارستانی ۱۸/۲ درصد و مبتلایان به اسهال متعاقب مصرف آنتی‌بیوتیک ۱۱/۵ درصد گزارش شدند. در مطالعه ما تکنیک جدید LAMP جهت تشخیص باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* برای اولین بار در ایران به کاربرده شد. با مقایسه مطالعه کنونی ما و مطالعات انجام شده در ارتباط با روش LAMP در تشخیص باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل*، می‌توان بیان کرد

که روش LAMP نسبت به مطالعات دیگر در تشخیص باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* از حساسیت و دقت بالاتری برخوردار است.

نتایج حاصل نشان داد که LAMP علاوه بر سادگی و کم هزینه بودن، دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده بنابراین می‌تواند به عنوان روشی روتین در مراکز تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Gohnson S, Gerding DN. Clostridium difficile-associated diarrhea. J Clin Infect 1998; 26(7): 1027-1036.
2. Ryu HS, Kim YS, Seo GS, Lee YM, Choi SC. Risk factors for recurrent Clostridium difficile infection. Intest Res 2012; 10(2): 176-182.
3. Lawrence SJ, Korzenik JR, Mundy LM. Probiotics for recurrent Clostridium difficile disease. J Med Microbiol 2005; 54(3): 905-906.
4. Kim J, Kang JO, Kim H, Seo MR, Choi TY, Pai H, et al. Epidemiology of Clostridium difficile infections in a tertiary-carehospital in Korea. Clin Microbiol Infect 2013, 19(6): 521-527.
5. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B. Evaluation of diagnostic tests for clostridium difficile infection. J Clin Microbiol 2010; 48(2): 606-608.
6. Luna RA, Boyanton BL, Mehta S, Courtney EM, Webb CR, Revell PA, et al. Rapid stool-based diagnosis of clostridium difficile infection by real-time pcr in a children s hospital. J Clin Microbiol 2011; 49(3): 851-857.
7. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanable K, Amino N, and et al. Loop-mediated isothermal amplification of dna. Nucleic Acids Res 2000; 28(12): E63.
8. Mori Y, Hirano T, Notoma T. Sequence specific visual detection of lamp reactions by adition cationic polymerase. BMC Biotec 2006; 21(4): 3-6.
9. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP):a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev Med Virol 2008; 18(6): 407-421.
10. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by Loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16(3): 223-229.
11. Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, Raoult D. Citratesynthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysisand identifi cation of Ehrlichia. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 3031-3039.
12. Mori YN, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother 2009; 15(2): 62-69.
13. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediatedisothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods 2007; 70(1): 499-501.
14. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplifi cation reaction using anondenatured template. Clin Chem 2001; 47(5): 1742-1743.

15. Jalali M, Khorvash F, Warriner K, Weese JS. Clostridium difficile infection in an Iranian hospital. BMC 2012; 21(5): 159.
16. Kato H, Yokoyama T, Kato H, Arakawa Y. Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of clostridium difficile in stool specimens by Loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2005; 43(12): 6108-6112.
17. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, Pepin J, et al. Clinlnical practicae guidelines for clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). J Infect Control Am 2010; 31(5): 431-455.
18. Goldenberg SD, Cliff PR, French GL. Glutamate dehydrogenase for laboratory diagnosis of clostridium difficile infection. J Clin Microbiol 2010; 48(8): 3050-3051.
19. Gursoy S, Guven K, Arikan T, Yurci A, Torun E, Baskol M, et al. Clostridium difficile infection frequency in patients with nosocomial infections or using antibiotics. Hepatogastroenterology 2007; 54(78): 1720-1724.
20. Salari MH. Enteropathogenic bacteria in stool samples of patients with diarrhea. Medical Scool 1999; 25(6): 22-24.
21. Norén T, Alriksson I, Andersson J, Akerlund T, Unemo M. Rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for Clostridium difficile detection challenges cytotoxin B cell test and culture as gold standard. J Clin Microbiol 2011; 49(2): 710-711.
22. Boyanton BL Jr, Sural P, Loomis CR, Pesta C, Gonzalez-Krellwitz L, Robinson-Dunn B, et al. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time pcr and enzyme immunoassay for toxigenic clostridium difficile detection. J Clin Microbiol 2012; 50(3): 640-645.