

Rôle du dosage de la protéine C-réactive et de la procalcitonine dans la prise en charge des pneumopathies infectieuses

Role of procalcitonin and C-reactive protein levels: a diagnostic tool in lower respiratory tract infections

Jihen Ben Amar, Haifa Zaibi, Kehna Bouzid, Saloua Azzabi, Mohamed Ali Bacca, Bisma Dahari, Hichem Aouina.

Service de pneumologie-hôpital Charles Nicolle / université Tunis El Manar /Faculté de médecine de Tunis

RÉSUMÉ

Prérequis : Les marqueurs biologiques usuels manquent de sensibilité et de spécificité en matière de pneumopathie aigue communautaire (PAC). Pour le clinicien, disposer d'un marqueur biologique parfaitement sensible et spécifique des infections bactériennes permettrait d'optimiser la prise en charge des patients fébriles et notamment de rationaliser les prescriptions antibiotiques. Le but de notre travail est de comparer l'apport de la procalcitonine (PCT) à celui de la protéine C réactive (CRP) et ceci dans la distinction des infections pulmonaires d'origine tuberculeuses des PAC et leur apport pour prédire de l'évolution des PAC.

Méthodes : Etude prospective incluant 100 patients d'âge moyen 45 ans, admis pour exploration d'une opacité pulmonaire quelque soit le motif de consultation. Ont été exclus tous les patients mis sous traitement antibiotique avant leur admission.

Résultats : Le taux de la PCT était significativement plus élevé chez les patients PAC (Groupe A) par rapport aux groupes TBC (Groupe B). De même, le taux de CRP était significativement plus élevé chez les patients PAC par rapport aux TBC ($p < 0,001$). Les valeurs de CRP ainsi que de la PCT étaient corrélées à l'évolution pour les PAC. Les valeurs moyennes de la CRP ainsi que de la PCT étaient plus élevées pour les PAC les plus sévères et la différence était statistiquement significative pour la CRP et la PCT entre les deux groupes A et B ($p = 0,01$). Les valeurs seuils de CRP et de la PCT qui pouvaient discriminer une PAC étaient respectivement : 35 mg/l et 0,12 ng/l.

Conclusion : La PCT constitue un bon marqueur pour poser le diagnostic et établir le pronostic des PAC. Elle permet de discriminer le diagnostic de PAC par rapport à celui de TBC.

Mots-clés

Protéine C-réactive, procalcitonine, pneumopathie aigue communautaire, tuberculose

SUMMARY

Background: Conventional biomarkers lack sensitivity and specificity for acute pulmonary Community (PAC). Procalcitonin (PCT) has been described in the literature for its usefulness in the PAC. The aim of our work was to study the contribution of the PCT in the positive diagnosis of PAC and in the initial assessment of the severity and the interest of CRP and PCT to distinguish lung infections from tuberculous origin of the PAC.

Methods: Prospective study of 100 middle-aged 45 years [16-82], admitted to our clinic for evaluation of lung opacity some of the reason for consultation. All patients with antibiotics before admission were excluded. We studied the clinical, radiological, biological and bacteriological characteristics of patients.

Results: The rate of PCT was significantly higher in PAC compared to TBC ($p < 0.001$). The values of CRP and PCT were correlated to changes in the PAC. The mean values of CRP and PCT were higher for the most severe PAC and the difference was statistically significant for CRP and PCT between the two ($p = 0.01$). The cut-off of CRP and PCT could discriminate a PAC values were 35 mg / l and 0.12 ng /ml.

Conclusion: The PCT is a good marker for diagnosis and the prognosis of PAC. It permits to discriminate diagnosing CAP compared to tuberculosis.

Key- words

C-reactive protein; Pneumonia, community acquired; Procalcitonin; Tuberculosis

Les pneumopathies aiguës communautaires (PAC) continuent à poser un problème de santé publique de part leur fréquence et leur gravité en particulier lorsqu'elles surviennent chez des sujets âgés, tarés et ou vivants en institution. L'antibiothérapie précoce permet de diminuer la fréquence des formes sévères et de mortalité ; d'où l'intérêt d'un diagnostic positif précoce [1]. Dans les pays où la prévalence de la tuberculose pulmonaire (TBC) est élevée, *Mycobacterium tuberculosis* est une cause fréquente de PAC [2-3] et le diagnostic différentiel entre TBC une pneumopathie reste difficile.

L'absence de signes spécifiques clinique et radiologique au cours des PAC et de la TBC et la faible rentabilité des examens bactériologiques rend difficile la distinction entre TBC et pneumopathie à germe non spécifique [4-5]. Les marqueurs biologiques traditionnels de l'infection telle que l'hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles manquent de sensibilité d'où l'intérêt d'utilisation de marqueur plus spécifique pour guider le diagnostic.

La pneumopathie infectieuse entraîne une importante réaction inflammatoire avec libération des médiateurs chimiques. Ces médiateurs, dont l'interleukine 6, stimulent la synthèse de protéines de la phase aiguë de l'inflammation telles que la protéine C réactive (CRP) et la procalcitonine (PCT) qui s'élèvent dans les heures qui suivent le début du processus infectieux. La PCT, précurseur de la calcitonine, hormone hypocalcémiant, est un des nouveaux marqueurs des infections bactériennes. Elle est détectable dès la 4^{ème} heure avec un pic à 6 heures et une demi-vie de 20 à 24 H [6-7]. Contrairement à la CRP, la PCT ne s'élève pas au cours des syndromes inflammatoires biologiques d'origine non bactérienne, de la TBC, de la pneumocystose et des mycobactérioses atypiques [8-9]. Ainsi, l'utilisation de dosages couplés de la CRP et la PCT peut être intéressante. La CRP par sa bonne sensibilité et la PCT par son excellente spécificité permettent dès l'admission d'orienter vers une origine infectieuse bactérienne.

Le but de notre travail est de comparer l'apport de la PCT à celui de la CRP et ceci dans la distinction des infections pulmonaires d'origine tuberculeuses des PAC et leur apport pour prédire de l'évolution des PAC.

MÉTHODES

Etude prospective menée chez 100 patients consécutifs hospitalisés dans le service de pneumologie de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis durant une année (Mars 2012-Avril 2013) pour exploration d'une opacité alvéolaire quelque soit le motif de consultation. Ne sont pas inclus les patients mis sous traitement antibiotique avant leurs admissions ou présentant un épanchement pleural isolé sans atteinte parenchymateuse. Parmi les patients inclus, 14 ont été exclus vu que les explorations ont conclu à un cancer bronchique non à petites cellules.

Quatre vingt six patients ont présenté soit une PAC

(Groupe A) ou une TBC (Groupe B). La PAC est définie par l'existence de symptômes cliniques (toux, expectorations, dyspnée et douleur thoracique) associés à un syndrome alvéolaire radiologique ou un syndrome interstitiel survenant dans un contexte fébrile.

Le diagnostic de TBC était retenu devant des bacilloscopies positives et confirmée par la mise en évidence de *Mycobacterium tuberculosis* à la culture. Nous avons étudié les caractéristiques cliniques, radiologiques, biologiques et bactériologiques des patients

La détermination quantitative de la PCT a été effectuée automatiquement avec un MINI VIDAS, utilisant une méthode immuno-luminométrique (LUMitest PCT TM, Brahms Diagnostica, Berlin, Germany). Les résultats sont exprimés en ng/ml, le domaine de mesure du test est de 0,05 ng/ml à 500 ng/ml, la sensibilité analytique est de 0,1 ng/ml. Une valeur de PCT ≥ 0.5 ng/ml a été considérée comme positive, le seuil ayant été choisi afin d'être en accord avec la littérature.

Le dosage de la CRP a été effectué sur un automate CX PRO par une méthode turbidimétrique. Une valeur de CRP ≥ 8 mg/ml a été prise en compte comme valeur positive, selon le seuil de détection du laboratoire.

Analyse statistique

Les données ont été analysées au moyen du logiciel SPSS version 19.0. Les comparaisons de 2 moyennes sur séries indépendantes ont été effectuées au moyen du test t de Student pour séries indépendantes, et en cas de faibles effectifs par le test non paramétrique de Mann et Whitney. La sensibilité et la spécificité pour les différentes valeurs du seuil de CRP et PCT ont été étudiées selon les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic). Nous avons fixé le seuil de signification à $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée :

Quatre vingt six patients ont été inclus dans notre étude, 67 patients avaient un PAC (Groupe A) et 19 patients avaient une TBC (Groupe B).

Les soixante sept patients hospitalisés pour pneumopathie communautaire aiguë, étaient âgés en moyenne de 45 ans (extrêmes : 12 - 82 ans). Il s'agit de 50 hommes et 17 femmes avec un sexe ratio à 2,9.

Le groupe TBC était composé de 19 patients avec un âge moyen de 44 ans (16-63 ans), il s'agissait de 10 hommes et 9 femmes avec un sexe ratio à 1,1.

Trente cinq patients (52%) ont bénéficié au moins d'un prélèvement bactériologique au cours de leur hospitalisation. Mais cette enquête n'était positive que chez 16 patients (46%). Il s'agissait d'un *Streptococcus pneumoniae* dans deux cas, de Bacilles Gram négatif (BGN) dans 8 cas (*Pseudomonas aeruginosa*,

Enterobacter, Klebsiella), de Staphylococcus aerus dans 4 cas et de legionnella pneumophila dans deux cas. La confirmation bactériologique de la TBC a été fait par la mis en évidence de bacille acido-alcoolo-résistant à l'examen direct des expectorations chez 8 patients, dans le liquide d'aspiration bronchique chez 2 patients. Les cultures étaient positives à *M. tuberculosis* dans tous les cas. Les données démographiques des patients, les symptômes et les résultats des analyses biologiques ont été comparé dans les 2 groupes (Tableau1).

Tableau 1: Caractéristiques cliniques et biologiques de la population d'étude

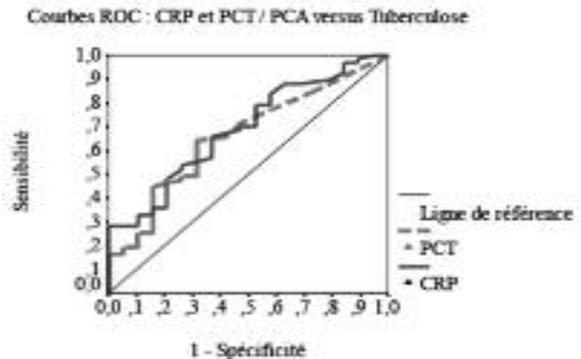
	PAC (n=67)	TBC (n=19)	p
Caractéristiques démographiques			
Age (an)	45	44	>0.05
Sexe : M/F	50/17	10/9	>0.05
Comorbidités			
Respiratoires	40(60%)	9(40%)	>0.05
Extra-respiratoires	34(50%)	8(42%)	>0.05
Symptômes			
Toux	40(60%)	5(31%)	0.051
Expectoration	39(58%)	11(63%)	0.053
Fièvre	43(67%)	11(63%)	>0.05
Dyspnée	35(52%)	5(31%)	>0.05
Sueurs nocturnes	0(0%)	7(37%)	<0.001
Perte de poids	0(0%)	11(63%)	<0.001
Douleurs thoraciques	13(19%)	5(31%)	0.08
Biologie			
Leucocytes/ mm3	13439 (3400 - 40500)	7675 (3890 -17800)	<0.001
CRP, mg/l	127 (8 - 486)	33(7 - 232)	<0.001
PCT, ng/ml	7,87 (0 - 200)	0,69 (0 - 6,84)	p <0,001
Données radiologiques			
Atteinte apicale	22(33%)	15(82%)	<0,001
Excavation	0(0%)	11(57%)	<0,001
Pleurésie	9(14%)	4(21%)	0.32

M/F : masculin/féminin ; NS : non significatif p>0.05

La valeur moyenne de la CRP était de 127mg/l (8-486 mg/l) chez les patients avec PAC et de 33 mg/L (7 -232 mg/L) chez les patients avec TBC (p<0,001). Le taux moyen de PCT chez les patients avec PAC et de TBC étaient respectivement de 7,87 ng/ml (0-200 ng/ml) et de 0,69ng/ml (0-6,84 ng/ml) (p <0,001).

La comparaison du taux de la PCT et la CRP entre les deux groupes A et B a montré une différence significative avec p=0,012 pour la CRP et p=0,03 pour la PCT. Les courbes ROC (figure 1) ont montré des aires sous la courbes qui sont> 0,5 permettant ainsi de déterminer les seuils de CRP et la PCT qui peuvent discriminer une PAC, ils étaient respectivement de 35 mg/l et 0,12 ng/ml

Figure 1 : Courbes ROC : CRP et PCT/PCA versus tuberculose



Nous avons réparti les patients du groupe PAC selon leur évolution sous traitement antibiotique indépendamment de la durée d'hospitalisation. (Tableau 2)

Tableau 2 : La répartition des patients selon leur évolution

Evolution	Nombre des patients	Total
Favorable	54	54
Défavorable	Transférés en réanimation=8 Décès=5	13

La mortalité globale dans la population étudiée était de 7,5%, l'âge moyen des patients décédés était de 69 ans contre 48 ans pour les patients survivants. Les patients décédés avaient des comorbidités associées à leur pathologie.

La valeur de la CRP ainsi que de la PCT étaient corrélée à l'évolution de la PAC. (Tableau 3) Nous avons trouvé des valeurs seuils permettant de prédire une évolution défavorable en fonction du taux moyen de la CRP et de la PCT (p=0,01) qui étaient de 50 mg/l et 0,75 ng/ml respectivement (Figure 2). Les intervalles de confiance des aires sous les courbes ROC CRP et PCT se chevauchent, les deux aires ne diffèrent pas significativement: nous pouvons donc retenir l'absence de supériorité de la PCT sur la CRP dans la détermination de l'évolution chez les patients du groupe PAC.

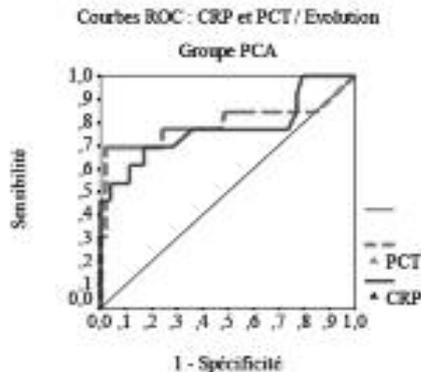
Tableau 3 : Evolution selon le taux moyen de CRP et de la PCT

CRP	Evolution	Nombre	Moyenne	Minimum	Maximum
	Favorable	54	59,33	8	265
	Défavorable	13	219,3	16	486
	Total	67			
Procalcitonine	Evolution	Nombre	Moyenne	Minimum	Maximum
	Favorable	54	1,11	0	27,47
	Défavorable	13	34,94	0	200
	Total	67			

Aire sous la courbe

Variable	Aire	p	Intervalle de confiance
CRP	0,773	0,089	0,598-0,947
Procalcitonine	0,795	0,001	0,61-0,979

Figure 2 : Courbes ROC : PCT/CRP et évolution



DISCUSSION

Les résultats de notre étude suggèrent que le dosage de CRP et de la PCT peuvent aider à la discrimination entre une TBC et PAC. Un taux bas de CRP et de PCT a été associé à un diagnostic de TBC comparé à la PAC.

En 2013, 3070 cas de tuberculose toutes formes confondues ont été notifiés dont 1003 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à frottis positif (TPM+). Le taux de notification des cas de tuberculose toutes formes était 28/100 000 habitant en 2013. Pour les TPM+, le taux de notification se situait autour 9 ou 10 cas pour 100 000 habitants durant la période 2010-2013.

L'identification et le traitement des cas de tuberculose infectieuse est recommandée comme la mesure la plus rentable de la lutte contre la maladie [10] ; en effet, la maîtrise de cette épidémie ne peut se réaliser qu'en limitant la transmission du bacille. Un patient tuberculeux contagieux peut infecter 10 à 20 personnes au cours de l'histoire naturelle de sa maladie dans les pays en voie de développement [11]. Lin X et al. ont rapporté que pour un patient tuberculeux contagieux, il faudrait environ un mois pour transmettre l'infection à tout son entourage [12].

D'autre part, en plus du risque de transmission de la maladie à l'entourage, il a été établi qu'un diagnostic tardif ayant des conséquences à la fois individuelles, en augmentant la morbi-mortalité [13-14] et collectives, en augmentant la contagiosité de la maladie [15-16]. Pour ces raisons, le délai de diagnostic constitue un indicateur important de la qualité d'un programme de lutte contre la TBC.

Les études qui se sont intéressées à l'intérêt de PCT dans le diagnostic et le pronostic de TBC chez des sujets VIH négatifs sont peu nombreuses.

Une étude prospective monocentrique a été faite entre juin 2008 et septembre 2009 au Japon ayant inclus des patients hospitalisés pour PCA et TBC [17]. 102 patients présentant une TBC, 62 patients présentant une PAC et 34 patients volontaires sains ont été inclus dans l'étude.

Tous les patients avaient une sérologie VIH négative.

Le taux de PCT chez les sujets tuberculeux était significativement plus faible que chez les patients ayant une PCA (0,21+0,49 versus 4,1+8,68 ng/l ; $p < 0,0001$). Les auteurs ont conclu que la PCT constitue donc un bon marqueur discriminatif entre TBC et PCA (l'aire sous la courbe ROC était de 0,866). D'autre part les auteurs concluent que la PCT joue un rôle dans l'estimation du pronostic au cours de la TBC; Les patients ayant un taux de PCT $\geq 0,5$ ng/l avaient une survie plus courte que ceux dont le taux était $< 0,5$ ng/l. Aucune différence n'a été trouvée dans notre étude par rapport à la supériorité de PCT à la CRP pour discriminer une TBC d'une PAC.

Kang et collaborateurs [18] dans une étude publiée en 2009, ont comparé l'utilité de la CRP et de la PCT pour distinguer la TBC des PAC dans une région où la prévalence de la TBC est moyenne. Ils ont inclus 87 patients dont 57 ayant une PAC bactérienne et 30 ayant une TBC. La valeur moyenne de la CRP en cas de PAC bactérienne était de 145,8 mg/L (étendue : 30 à 366,1 ng/ml) vs 52,7 mg/L (étendue : 2,4 à 132,2 ng/ml) en cas de TBC ($p < 0,001$).

La valeur moyenne de la PCT était de 0,514 ng/ml (étendue : 0,01 à 27,75 ng/ml) en cas de PAC bactérienne vs 0,029 ng/ml (étendue : 0,01 à 0,87 μ g/L) en cas de TBC ($p < 0,001$). Ils ont trouvé que les deux marqueurs n'étaient pas différents dans leur valeur discriminative ($p = 0,733$).

Plusieurs études ont réalisées surtout dans le but d'évaluer l'apport du dosage de la PCT dans le diagnostic positif des PAC et pour pouvoir guider l'antibiothérapie dans ce cas. L'équipe de Christ-Crain et coll a mis en place une étude qui a démontré les bénéfices de la PCT dans l'utilisation des antibiotiques en milieu hospitalier [19]. Les patients consultant aux urgences pour suspicion d'infection respiratoire basse étaient randomisés en deux groupes : Un premier groupe pour lequel l'antibiothérapie était guidée par le dosage de la PCT. Les patients étaient classés en quatre sous-groupes. Un taux de PCT inférieur à 0,1 ng/ml suggérait l'absence d'infection bactérienne et l'initiation de l'antibiothérapie était fortement déconseillée. Un taux de PCT compris entre 0,1 et 0,25 ng/ml indiquait qu'une infection bactérienne était peu probable et l'initiation de l'antibiothérapie était déconseillée. Un taux de PCT compris entre 0,25 et 0,5 ng/ml indiquait une possible infection bactérienne et l'initiation de l'antibiothérapie était conseillée. Un taux de PCT supérieur à 0,5 ng/ml suggérait la présence d'une infection bactérienne et l'antibiothérapie était fortement conseillée. Le deuxième groupe était pris en charge de façon habituelle. Les deux groupes étaient comparables à l'inclusion et dans leur profil évolutif à 30 jours. Dans le groupe standard, 83% des patients ont reçu des antibiotiques contre 18 patients (44%) du groupe guidé par la PCT. Cette étude a montré que la PCT était un excellent outil de décision dans un contexte d'urgence,

dans ce cadre précis des infections respiratoires basses. Les auteurs avancent l'idée que si cette politique s'appliquait à la consultation en ville, on pourrait diminuer la prescription d'antibiotiques de presque 50 % [19-20]. Les points faibles de notre étude étaient surtout le petit nombre de sujets d'étude et l'absence de suivi de la cinétique de la PCT et de la CRP après instauration du traitement. Quel que soit le marqueur considéré (CRP, PCT) aucun n'est suffisamment fiable pour remplacer l'évaluation diagnostique actuelle chez un malade suspect d'avoir développé une PAC. Par conséquent, on ne peut pas recommander de se baser sur leur taux (ou l'évolution des taux) pour initier un traitement antibiotique. Ils ont en revanche une bonne valeur pronostique, et la PCT est, parmi les marqueurs disponibles en pratique

courante, probablement celui qui est le plus fiable ; une baisse sous traitement étant associée à un bon pronostic alors qu'une absence de diminution (ou a fortiori une élévation) sous traitement est un argument de mauvais pronostic.

CONCLUSION

Dans notre pratique de médecins hospitaliers, le dosage de la PCT devrait être réservé au cas de doute diagnostique et de situations où existe une discordance entre la clinique et les autres marqueurs biologiques. En résumé, quel que soit le marqueur considéré, aucun ne semble être assez sensible ou spécifique pour permettre de remplacer l'évaluation habituelle de ces malades.

Références

1. Marrie T.J. Community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1994;18:501-13.
2. Ishida T. Etiology of community-acquired pneumonia among adult patients in Japan. *Jpn J Antibiot.* 2000;53 Suppl B:3-12.
3. Liam CK, Pang YK, Poosparajah S. Pulmonary tuberculosis presenting as community-acquired pneumonia. *Respirology.* 2006;11:786-92.
4. Kiyan E, Kilicaslan Z, Gurgan M, Tunaci A, Yildiz A. Clinical and radiographic features of pulmonary tuberculosis in non-AIDS immunocompromised patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:764-70.
5. Lieberman D, Schlaeffer F, Porath A. Community acquired pneumonia in old age: a prospective study of 91 patients admitted from home. *Age Ageing.* 1997;26:69-75.
6. Suzanne B, Cohen R, Nicholas P, Cucherat M, Perret GY. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2006;34:1996-2003.
7. De Werra I, Jaccard C, Corradin SB, et al. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med.* 1997;25:607-13.
8. Polzin A, Pletz M, Erbes R, et al. Procalcitonin as a diagnostic tool in lower respiratory tract infections and tuberculosis. *Eur Respir J.* 2003;21:939-43.
9. Schleicher GK, Herbert V, Brink A, et al. Procalcitonin and C Reactive protein levels in HIV-positive subjects with tuberculosis and pneumonia. *Eur Respir J.* 2005;25:688-92.
10. Currie CSM, Floyd K, Williams BG, Dye C. Cost, affordability and cost effectiveness of strategies to control tuberculosis in countries with high HIV prevalence. *BMC Public Health.* 2005;5:130
11. Lawn SD, Afif B, Acheampong JW. Pulmonary tuberculosis: diagnostic delay in Ghanaian adults. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2:635-40.
12. Lin X, Chongsuvivatwong V, Lin L, Geater A, Lijuan R. Dose-response relationship between treatment delay of smear-positive tuberculosis patients and intra household transmission: a cross-sectional study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:797-804
13. Rossato Silva D, Müller AM, Dalcin Pde T. Factors associated with delayed diagnosis of tuberculosis in hospitalized patients in a high TB and HIV burden setting: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2012;12:57
14. Saffron N, Haldal E, Pavlovic S, Vuckovic D, Boe J. Why do our patients die of active tuberculosis in the era of effective therapy? *Tuber and Lung Dis.* 1994;75:329-33.
15. Madebo T, Lindtjorn B. Delay in treatment of pulmonary Tuberculosis: An analysis of symptom duration among Ethiopian patients. *Medscape General Medicine.* 1999; E6.
16. El-Sony A, Enarson D, Khamis A, Baraka ON, June G. Relations of grading of sputum smears with clinical features of tuberculosis in patients in routine practice in Sudan. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:91-7.
17. Ugajin M, Miwa S, Shira M et al. Usefulness of serum procalcitonin levels in pulmonary tuberculosis. *Euro Respir J.* 2011;37:371-75
18. Kang YA, Kwon SY, Yoon HI, Lee JH, Lee CT. Role of C-reactive protein and procalcitonin in differentiation of tuberculosis from bacterial community acquired pneumonia. *Korean J Intern Med.* 2009; 24:337-42
19. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet.* 2004; 363:600-7
20. Müller B, Schuetz Ph, Christ-Crain M. Procalcitonine. *Nova Forum Med Suisse.* 2008;8 :288-390.