

Nghiên cứu nồng độ cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 huyết thanh trước và sau điều trị ở bệnh nhân trứng cá thông thường mức độ vừa và nặng

Study of the serum levels of cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-8, and IL-12 before and after treatment in patients with moderate and severe acne vulgaris

Nguyễn Ngọc Oanh*,
Phạm Thị Minh Phương**,
Bùi Thị Vân***

**Bệnh viện Bạch Mai,*
***Bệnh viện Da liễu Trung ương,*
****Viện NCKH Y Dược lâm sàng 108*

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định nồng độ cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 trong huyết thanh bệnh nhân trứng cá thông thường (TCTT) mức độ vừa và nặng trước và sau điều trị. **Đối tượng và phương pháp:** Thử nghiệm lâm sàng có đối chứng. Nhóm bệnh: 90 bệnh nhân TCTT mức độ vừa và nặng (theo phân loại Lehmann) và 45 người khỏe mạnh. Phương pháp định lượng cytokin bằng kỹ thuật hấp phụ miễn dịch vi hạt huỳnh quang tại Bộ môn Miễn dịch - Học viện Quân y. **Kết quả:** Nồng độ cytokine IL-12 huyết thanh ở bệnh nhân TCTT mức độ vừa và nặng cao hơn nhóm người khỏe có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Nồng độ IL-1 α , IL-1 β và IL-12 ở bệnh nhân TCTT mức độ nặng cao hơn mức độ vừa, có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nồng độ IL-1 β và IL-12 sau điều trị giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ($p < 0,001$). **Kết luận:** Nồng độ IL-12 huyết thanh ở bệnh nhân TCTT mức độ vừa và nặng cao hơn nhóm người khỏe mạnh và có mối liên quan với mức độ bệnh. Nồng độ IL-1 β và IL-12 sau điều trị giảm so với trước điều trị.

Từ khóa: Bệnh trứng cá thông thường, cytokine huyết thanh, isotretinoin kết hợp kẽm.

Summary

Objective: To determine the levels of cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-8, and IL-12 in the serum of moderate and severe acne vulgaris (AV) patients before and after treatment. **Subject and method:** A controlled clinical trial. Patient group: 90 patients with moderate and severe AV (according to Lehmann classification) and 45 healthy individuals. Cytokine quantification method using fluorescence covalent microbead immunosorbent assay at the Department of Immunology - Military Medical Academy. **Result:** The serum IL-12 levels in moderate and severe AV patients were significantly higher than those in the healthy group ($p < 0.05$). The serum levels of IL-1 α , IL-1 β , and IL-12 in severe AV patients were higher than in the moderate group, with statistical significance ($p < 0.05$). The serum levels of IL-1 β and IL-12 after treatment decreased with statistical significance compared to before treatment ($p < 0.001$). **Conclusion:** The serum IL-12 levels in moderate and severe AV patients are higher than those in the

Ngày nhận bài: 01/02/2024, ngày chấp nhận đăng: 13/02/2024

Người phản hồi: Nguyễn Ngọc Oanh, Email: nguyen.ngoc.oanh.2011@gmail.com - Bệnh viện Bạch Mai

healthy group and are related to the severity of the disease. The serum levels of IL-1 β and IL-12 decrease significantly after treatment.

Keywords: Acne vulgaris, serum cytokines, isotretinoin combined with zinc.

1. Đặt vấn đề

Trứng cá thông thường (TCTT) là bệnh của nang lông tuyến bã, hay gặp tuổi vị thành niên và trưởng thành. Lâm sàng điển hình là nhân trứng cá (nhân đầu trắng, nhân đầu đen), sẩn viêm, mụn mủ và cục, nang. Sinh bệnh học bao gồm tăng tiết bã nhờn, tăng sừng hóa cổ nang lông, vai trò của mầm vi trùng với vai trò chính là vi khuẩn *C. acnes* và phản ứng viêm. Trong đó, vai trò của các cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 đã được nhiều tác giả báo cáo có liên quan đến sự khởi phát và mức độ nghiêm trọng của bệnh [1], [5], [6], [8], [9].

Isotretinoin (ISO) là thuốc tác động đến cả 4 cơ chế quan trọng trong sinh bệnh học trứng cá, đáp ứng điều trị cả trong các trường hợp trứng cá nặng. Việc kết hợp ISO và kẽm trong điều trị làm gia tăng hiệu quả, đồng thời giảm được tác dụng phụ khi sử dụng ISO. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về sự thay đổi nồng độ các cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 trong huyết thanh bệnh nhân TCTT mức độ vừa và nặng trước và sau điều trị. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Xác định nồng độ cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 huyết thanh trước và sau điều trị ở bệnh nhân TCTT mức độ vừa và nặng.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

90 bệnh nhân TCTT mức độ vừa và nặng, điều trị ngoại trú tại Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 8/2022 đến tháng 5/2023 và 45 người khỏe mạnh tương đồng về tuổi và giới.

Tiêu chuẩn chọn: Nhóm bệnh: Bệnh nhân TCTT mức độ vừa, nặng theo phân loại của Lehmann-2002, ≥ 18 tuổi, chấp thuận tham gia nghiên cứu; và nhóm người khỏe (NNK): Tương đồng về tuổi, giới với nhóm bệnh.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân trứng cá các thể khác, < 18 tuổi, bệnh nhân không chấp thuận tham gia nghiên cứu. Bệnh nhân đang hoặc đã sử dụng kẽm và các sản phẩm chứa kẽm trong vòng 3 tháng

trước khi khám. Bệnh nhân đang có ý định sinh, đang cho con bú.

2.2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Thử nghiệm lâm sàng có đối chứng.

Các bước tiến hành:

Nhóm bệnh:

Khám, tuyển chọn bệnh nhân TCTT mức độ vừa, nặng (theo phân loại Lehmann). Lấy máu lần 1 trước điều trị cho nhóm bệnh.

Tiến hành điều trị: 90 bệnh nhân TCTT mức độ vừa, nặng được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi nhóm 45 người. Nhóm nghiên cứu (NNC): Uống isotretinoin 20mg/ngày kết hợp uống kẽm 40mg/ngày trong 4 tháng và nhóm đối chứng (NĐC): Uống isotretinoin 20mg/ngày đơn thuần trong 4 tháng.

Kết thúc 4 tháng điều trị và lấy máu xét nghiệm lần 2.

Nhóm người khỏe (NNK): Cùng tuổi và giới với nhóm người bệnh. Lấy máu xét nghiệm 1 lần duy nhất.

Mẫu bệnh phẩm máu của nhóm bệnh và nhóm người khỏe được lấy vào buổi sáng, ly tâm tách huyết thanh sau đó được bảo quản, lưu ở nhiệt độ âm 80°C. Khi đủ số mẫu được vận chuyển đến Bộ môn Miễn dịch - Học viện Quân y để định lượng nồng độ các cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 huyết thanh bằng kỹ thuật hấp phụ miễn dịch vi hạt huỳnh quang.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập, nhập và xử lý trên phần mềm thống kê IBM SPSS statistics 29.0.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được sự chấp thuận của Bệnh viện Bạch Mai. Các đối tượng đồng ý tham gia nghiên cứu theo mẫu phiếu chấp thuận. Các số liệu được trình bày ở dạng báo cáo tổng hợp nên đảm bảo bí mật thông tin cá nhân của đối tượng.

3. Kết quả

Bảng 1. So sánh đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm		Nhóm bệnh (n = 90)		NNK (n = 45)		p
		Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	
Giới tính	Nam	36	40,0	18	40,0	1,000
	Nữ	54	60,0	27	60,0	
Tuổi trung bình		25,28 ± 6,40		25,09 ± 6,46		0,873
BMI trung bình		21,29 ± 2,02		21,28 ± 2,11		0,971

Nhận xét: Nhóm bệnh và nhóm người khỏe không có khác biệt về giới tính, độ tuổi trung bình và BMI trung bình.

Bảng 2. So sánh nồng độ IL-1α, IL-1β, IL-8 và IL-12 huyết thanh của nhóm bệnh trước điều trị và nhóm người khỏe

Cytokine (pg/ml) (Trung vị (Khoảng tứ vị))	Nhóm bệnh (n = 90)	Nhóm người khỏe (n = 45)	p
IL-1α	0,092 (0,021-0,421)	0,092 (0,021-0,092)	0,109
IL-1β	1,655 (0,812-6,175)	0,812 (0,812-4,939)	0,182
IL-8	0,225 (0,070-0,758)	0,225 (0,070-0,225)	0,336
IL-12	207,570 (1,421-380,979)	114,798 (1,421-242,539)	0,024

Nhận xét: Nồng độ IL-12 huyết thanh ở bệnh nhân trứng cá thông thường mức độ vừa, nặng cao hơn nhóm người khỏe có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,05$.

Bảng 3. Mối liên quan giữa nồng độ cytokine IL-1α, IL-1β, IL-8 và IL-12 huyết thanh nhóm người bệnh với mức độ bệnh (n = 90)

Cytokine (pg/ml) (Trung vị (Khoảng tứ vị))	Mức độ vừa (n = 61)	Mức độ nặng (n = 29)	p
IL-1α	0,092 (0,031-0,198)	0,092 (0,021-1,513)	0,009
IL-1β	0,812 (0,812-4,601)	4,939 (0,812-7,308)	0,019
IL-8	0,225 (0,070-0,648)	0,070 (0,070-4,734)	0,769
IL-12	162,720 (1,421-288,074)	305,171 (186,272-510,143)	0,002

Nhận xét: IL-1α, IL-1β và IL-12 ở bệnh nhân TCTT mức độ nặng cao hơn mức độ vừa, có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 4. So sánh nồng độ IL-1α, IL-1β, IL-8 và IL-12 huyết thanh của nhóm bệnh sau điều trị và nhóm người khỏe

Cytokine (pg/ml) (Trung vị (Khoảng tứ vị))	Nhóm bệnh (n = 90)	Nhóm người khỏe (n = 45)	p
IL-1α	0,092 (0,092-0,302)	0,092 (0,021-0,092)	0,012
IL-1β	0,812	0,812 (0,812-4,939)	<0,001
IL-8	0,225 (0,077-0,225)	0,225 (0,070-0,225)	0,269
IL-12	1,421 (0,021-3,279)	114,798 (1,421-242,539)	<0,001

Nhận xét: Nồng độ IL-1 β và IL-12 ở bệnh nhân TCTT sau điều trị thấp hơn nhóm người khỏe có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Nồng độ IL-1 α ở bệnh nhân TCTT sau điều trị cao hơn nhóm người khỏe có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 5. So sánh nồng độ IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 huyết thanh của nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng

Cytokine (pg/ml) (Trung vị (Khoảng tứ vị))		Nhóm nghiên cứu (n = 45)	Nhóm đối chứng (n = 45)	p
IL-1 α	Trước điều trị	0,092 (0,021-0,595)	0,092 (0,021-0,337)	0,494
	Sau điều trị	0,092 (0,092-0,275)	0,092 (0,092-0,332)	0,766
	p	0,434	0,691	
IL-1 β	Trước điều trị	3,527 (0,812-7,308)	1,655 (0,812-3,527)	0,116
	Sau điều trị	0,812	0,812	0,180
	p	<0,001	<0,001	
IL-8	Trước điều trị	0,225 (0,070-0,794)	0,225 (0,070-0,819)	0,427
	Sau điều trị	0,225 (0,077-0,225)	0,225 (0,077-0,225)	0,877
	p	0,165	0,354	
IL-12	Trước điều trị	234,272 (1,421-395,383)	169,564 (1,421-288,375)	0,264
	Sau điều trị	1,421 (0,012-2,259)	1,421 (0,133-3,825)	0,341
	p	<0,001	<0,001	

Nhận xét: Nồng độ IL-1 β và IL-12 ở bệnh nhân TCTT sau điều trị giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ở cả 2 nhóm, đều với $p < 0,001$. Nồng độ IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 sau điều trị giữa 2 nhóm không khác biệt, với $p > 0,05$. Nồng độ các cytokin của 2 nhóm cả trước và sau điều trị đều tương đương nhau, đều với $p > 0,05$.

4. Bàn luận

Bệnh trứng cá là bệnh lý viêm được điều hòa bất thường bởi hệ thống miễn dịch bẩm sinh. Trong quá trình mụn viêm, vi khuẩn *C. acnes* kích hoạt các tế bào bằng cách tương tác với các nhóm thụ thể xuyên màng Toll-like receptor (TLR) là TLR2 và TLR4. Sự tương tác này dẫn đến việc sản xuất các cytokine gây viêm bao gồm TNF- α , IL-1 α , IL-8 và IL-12 [7]. Vi khuẩn *C. acnes* cũng hoạt hóa NLRP3 của inflammasome trong bào tương của bạch cầu đa nhân trung tính và bạch cầu đơn nhân, dẫn đến phóng thích IL-1 β [9]. IL-1 có 2 dạng là IL-1 α (159 acid amin) và IL-1 β (153 acid amin) cùng gắn vào một loại thụ thể tế bào (IL-1R1) và có hoạt tính sinh học tương đương nhau, được

biểu hiện ở hầu hết các tế bào. Trong bệnh trứng cá, hoạt hóa IL-1 xảy ra trước tăng sản xung quanh nang lông chưa mắc bệnh và đây là yếu tố thúc đẩy hoạt hóa tế bào sừng. IL-8 làm tăng thu nhận bạch cầu đa nhân trung tính, phóng thích các men tiêu thể và gây ra sự phá vỡ biểu mô trong nang lông - tuyến bã, tăng cường phản ứng viêm. IL-12 có tác dụng thúc đẩy phản ứng chuyển dạng tế bào Th0 thành tế bào Th1, từ tế bào Th1 tiết ra IL-2, TNF- α , IFN- γ , CD40, TGF- β , từ đó thúc đẩy đáp ứng viêm qua tế bào.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 trong huyết thanh ở người bệnh trứng cá cao hơn nhóm người khỏe, trong đó nồng độ IL-12 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới mà chúng tôi tham khảo được. Nghiên cứu của Ayat S trên 70 bệnh nhân trứng cá và 20 người khỏe mạnh, nồng độ IL-1 α huyết thanh tăng cao đáng kể ở nhóm bệnh trứng cá so với nhóm khỏe mạnh ($p < 0,05$) [4]. Tác giả Ahmed và cộng sự (2022) đánh giá nồng độ IL-1 β huyết thanh

ở 58 bệnh nhân trứng cá ($128,56 \pm 71,06\text{pg/ml}$) cao hơn ở nhóm khỏe mạnh 32 người ($114,86 \pm 47,81\text{pg/ml}$) [2]. Zahraa và cộng sự (2020) thực hiện thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng với 30 bệnh nhân trứng cá mức độ trung bình và nặng được chia làm hai nhóm: Nhóm A (doxycycline 100mg) và nhóm B (doxycycline 100mg + vitamin C 500mg). Định lượng cytokine IL-1 β và IL-8 trong huyết thanh bệnh nhân (trước và sau 30 ngày điều trị) và nhóm chứng (30 người khỏe mạnh). Kết quả nồng độ các cytokine IL-1 β và IL-8 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,001$) [10]. Tác giả Mohamed và cộng sự (2022) báo cáo nồng độ IL-12 ở bệnh nhân trứng cá là 5,8 (1,7-10,8) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm người khỏe là 4,6 (1,0-8,8), với $p < 0,001$ [7]; tương tự với tác giả Amel và cộng sự (2014) [3]. Tại Việt Nam, tác giả Châu Văn Trở và Nguyễn Việt Thanh Phúc (2019) khảo sát trên 80 bệnh nhân TCTT và 80 người khỏe mạnh, nồng độ IL-8 trong huyết thanh của bệnh nhân TCTT ($22,05 \pm 49,89\text{pg/ml}$) cao hơn so với nhóm chứng ($6,24 \pm 8,45\text{pg/ml}$), với $p < 0,001$ [1].

Theo Bảng 3, nồng độ IL-1 α , IL-1 β và IL-12 ở nhóm bệnh nhân TCTT mức độ nặng trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn có ý nghĩa thống kê so với mức độ vừa ($p < 0,05$). Tác giả Demina và cộng sự (2017) kết luận mức độ IL-1 α trong huyết thanh có xu hướng tăng lên ở mức độ nhẹ đến trung bình và tăng lên đáng kể ở những bệnh nhân trứng cá mức độ nặng [5]. Báo cáo của Monib và cộng sự (2022) cũng xác định IL-1 β huyết thanh có mối tương quan thuận đáng kể với điểm số GAGS ($p < 0,001$), bệnh càng nặng thì nồng độ IL-1 β huyết thanh càng cao [8]. Mohamed và cộng sự (2022) cho thấy không có sự khác biệt về IL-12 giữa các nhóm mức độ bệnh ($p = 0,489$) [7]. Tại Việt Nam, tác giả Châu Văn Trở tìm thấy sự tương quan thuận có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ IL-8 trong huyết thanh với mức độ nặng của bệnh ($p < 0,05$) [1]. Nghiên cứu của chúng tôi chưa thấy có sự khác biệt về nồng độ IL-8 với mức độ bệnh như của tác giả Châu Văn Trở, có thể do chúng tôi chỉ lựa chọn các bệnh nhân ở mức độ vừa và nặng, còn tác giả Châu Văn Trở phân tích trên cả 3 nhóm mức độ nhẹ, vừa, nặng nên sự khác biệt rõ hơn.

Nghiên cứu của Zahraa (2020) so sánh nồng độ IL-1 β và IL-8 sau 30 ngày điều trị bằng doxycycline (nhóm A) và doxycycline-vitamin C (nhóm B), kết quả nồng độ các cytokine sau điều trị của nhóm B giảm tốt hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm A [10]. Ngoài ra, chúng tôi chưa thấy có tác giả tại Việt Nam và thế giới nghiên cứu về sự thay đổi nồng độ các cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 trước và sau khi điều trị bằng ISO đơn thuần hay kết hợp ISO-kẽm. Kết quả tại Bảng 4, nồng độ IL-1 β và IL-12 ở bệnh nhân TCTT sau điều trị thấp hơn nhóm người khỏe có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Trong khi đó, nồng độ IL-1 α ở bệnh nhân TCTT sau điều trị vẫn cao hơn nhóm người khỏe có nghĩa thống kê ($p < 0,05$) phần nào cho thấy có thể đáp ứng viêm vẫn chưa hoàn toàn được kiểm soát, mặc dù hiệu quả điều trị đã đạt được trên lâm sàng. Điều này dẫn đến bệnh trứng cá có thể tái phát ở nhiều bệnh nhân khi ngưng điều trị sớm với isotretinoin.

Theo Bảng 5, nồng độ IL-1 β và IL-12 ở bệnh nhân TCTT sau điều trị giảm so với trước điều trị có ý nghĩa thống kê ở cả 2 nhóm điều trị kết hợp ISO-kẽm lẫn nhóm điều trị ISO đơn thuần ($p < 0,001$); nồng độ IL-1 α và IL-8 sau điều trị có giảm nhưng không khác biệt so với trước điều trị ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt về nồng độ IL-1 α , IL-1 β , IL-8 và IL-12 sau điều trị ở nhóm sử dụng ISO-kẽm và nhóm ISO đơn thuần. Những phát hiện này của chúng tôi có ý nghĩa khẳng định vai trò của ISO là thuốc tác dụng mạnh lên cả 4 cơ chế bệnh sinh trứng cá, đặc biệt là tác dụng ức chế phản ứng viêm. Đồng thời cho thấy cytokine cũng có thể là mục tiêu phát triển cho phương pháp điều trị nhắm trúng đích mới với bệnh trứng cá trong tương lai.

5. Kết luận

Trước điều trị: Nồng độ IL-12 huyết thanh ở bệnh nhân trứng cá thông thường mức độ vừa và nặng cao hơn nhóm người khỏe mạnh và có mối liên quan với mức độ nặng của bệnh còn IL-1 α , IL-1 β , IL-8 sự thay đổi chưa có ý nghĩa.

Sau điều trị: Nồng độ IL-1 β và IL-12 giảm so với trước điều trị còn IL-1 α , IL-8 sự thay đổi chưa có ý nghĩa.

Tài liệu tham khảo

1. Châu Văn Trở, Nguyễn Việt Thanh Phúc (2019) *Nồng độ interleukin-8 trên bệnh nhân bệnh trứng cá thông thường tại Bệnh viện Da liễu TP. Hồ Chí Minh*. Tạp chí Y Dược lâm sàng 108 14(7), tr. 56-61.
2. Ahmed SI, Maha FN (2022) *Evaluation of the Serum Level of Cytokines IL-1B, IL-17 for some Patients with Acne Vulgaris in Baquba City*. Journal of Pharmaceutical Negative Results 13(S01).
3. Amel ISM, Ghada FAE-KM, Soha Younes, Atef IE (2014) *Assessment of IL-12 serum level in patients with inflammatory acne vulgaris and its correlation with its severity*. Journal of the Turkish Academy of Dermatology 8(2).
4. Ayat SS, Ali NS (2020) *Evaluation of IL-1 α and IL-10 Asociation with Acne In The Province of Thi-Qar*. Journal of Education for Pure Science- University of Thi-Qar 10(1).
5. Demina O, Kartelishev A, Karpova E, Danischuk O (2017) *Role of Cytokines in the Pathogenesis of Acne*. International Journal of Biomedicine 7(1): 37-40.
6. Joanne LS, Tomasz K, Terence K and Kenneth L (2013) *Toll-like receptor 2 activation and comedogenesis: Implications for the pathogenesis of acne*. BMC Dermatology 13: 10.
7. Mohamed M, Shehata HAA, Fahmy NF, Saleh R (2022) *Evaluation of serum levels of interleukins 1-beta, 10 and 12 in patients with acne vulgaris*. J Cosmet Dermatol 21(12): 7100-7106.
8. Monib KME, El-Fallah AA, Salem RM (2022) *Inflammatory markers in acne vulgaris: Saliva as a novel diagnostic fluid*. J Cosmet Dermatol 21(3): 1280-1285.
9. Qin M, Pirouz A, Kim MH, Krutzik SR, Garban HJ, Kim J (2014) *Propionibacterium acnes Induces IL-1beta secretion via the NLRP3 inflammasome in human monocytes*. J Invest Dermatol 134(2): 381-388.
10. Zahraa IJ, Shubber EJAM, Al-Shibly IK (2020) *Clinical and Immunological Response to Doxycycline Versus Doxycycline Plus Vitamin C in Patients with Acne Vulgaris*. International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance 11(01): 69-75.