

pulular de *Proteus mirabilis* sobre ureteral Stents: Uma avaliação comparativa *

JAMES D. Watterson, MD, ¹ PETER A. Cadieux, MD, ² DAVID Stickler, MD, ³
GREGOR REID, MD, ² e John D. DENSTEDT, MD ¹

ABSTRATO

Antecedentes e Propósito: Incrustação em stents de demora ureterais é geralmente relacionada com a presença de bactérias produtoras de urease que elevam o pH da urina através da hidrólise da ureia, o que resulta na precipitação de sais de cálcio e de magnésio. Usando um modelo previamente demonstrado para medir com precisão a capacidade de *Proteus mirabilis* para enxame sobre superfícies cateter (Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 206), foi investigada a capacidade deste organismo para enxame ao longo de três stents uretrais com potenciais propriedades encrustationresistance.

Materiais e métodos: Três stents uretrais disponíveis comercialmente foram selecionados para avaliação: um stent de superfície de baixa-energia, um stent hidrogel-revestido, e uma órtese de silicone. alíquotas de dez microlitros de uma cultura de 4 horas de *P. mirabilis* 296 em tripticase de soja (TSA) de caldo foi inoculada 5 milímetros de um canal de 1 cm cortados a partir de placas de TSA. secções stent dez milímetros foram colocados como pontes entre o canal central adjacente aos inóculos. Tempo de cruzamento patógeno foi medido.

Resultados: Enquanto isso (6 SD) para a migração de agentes patogénicos entre os três materiais de ensaio foi de 15,9 6 6.1, 19.8 6 9,5, e 29,7 6 14,3 horas para a superfície de baixa energia, de hidrogel revestidos, e stents de silicone, respectivamente. A análise estatística revelou diferenças significativas entre os tempos de passagem da superfície de baixa energia (*P* 5 0,001) e revestido-hidrogel (*P* 5 0,034) em comparação com os stents de silicone mas não entre a superfície de baixa energia e os stents revestidos de hidrogel (*P* 5 0,387).

Conclusão: migração de *P. mirabilis* 296 através de silicone stents foi significativamente reduzido em comparação com superfície de baixa energia e os stents revestidos de hidrogel. Estas descobertas sugerem que *P. mirabilis* pode ter uma afinidade mais baixa para os stents de silicone, o que pode trazer-se numa redução do risco de infecção com *P. mirabilis* e associada incrustação stent.

INTRODUÇÃO

BOMATERIALS DE AGONIAS URINÁRIAS são colocados a longo prazo de colocação de dispositivos no interior do tracto urinário. Incrustação, o processo pelo qual cristalóides e colóides aderir a biomaterial superfícies, ¹ pode ocorrer em sistemas não-infectadas, mas é mais proeminente na presença de bactérias produtoras de urease, com *Proteu* espécies sendo o mais comum. ² A hidrólise de ureia gera amoníaco, resultando em elevação de

pH urinário e subsequente precipitação de fosfatos de cálcio e magnésio. A acumulação destes biofilmes cristalinos podem, eventualmente bloquear cateteres e stents uretrais ureterais, muitas vezes resultando em morbidade significativa paciente. ³

A aderência bacteriana e espalhamento são considerados como passos importantes na patogênese da infecção e a oclusão do stent, e eles são parcialmente dependente das propriedades físico-químicas da superfície do material e em moléculas adsorvidas de superfície que actuam como mediadores da adesão. ⁴ A alteração de aderência bacteriana e a formação de biofilmes por meio da modificação de poli-

¹ Divisão de Urologia da Universidade de Western Ontario, London, Ontário, Canadá.

² Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Western Ontario, London, Ontario.

³ Escola de Cardiff de Biociências, Universidade de Cardiff, País de Gales, Reino Unido. ?? Apresentado no 96ª Reunião da Associação

Americana de Urologia, Anaheim, Califórnia, 2001.

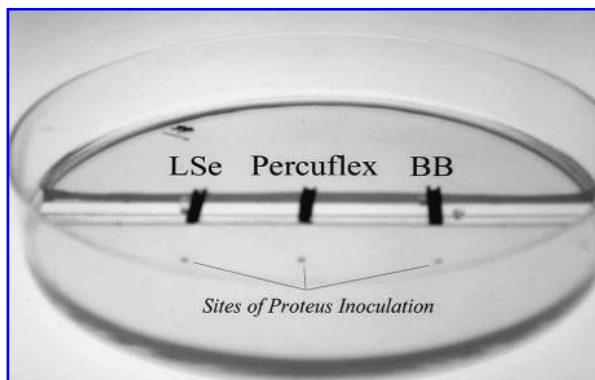


FIG. 1. secções stent dez milímetros colocados como pontes entre canais centrais de placas de TSA. Dez microlitros de 4 horas de cultura *Proteus mirabilis* 296 foi inoculada 5 mm da extremidade da ponte. LSe 5 baixa energia superficial; BB 5 Beleza Negra.

materiais de stent meric é uma abordagem para reduzir o bloqueio do stent incrustação. Neste estudo, a capacidade de *Proteus mirabilis* 296, um isolado clínico, para enxame ao longo de três tipos de stents disponíveis comercialmente, cada uma com as suas próprias propriedades únicas propostas para reduzir incrustações, foi avaliada. Nossa hipótese é que a medição de *P. mirabilis* de ligação 296, a diferenciação em Swarms, e translocação através de diferentes materiais de stent pode em última análise, correlacionam-se com a taxa de incrustação de stent, tal como a diferenciação em Swarms é conhecido por ser acompanhada por um aumento de 30 vezes na produção de urease. ⁵

MATERIAIS E MÉTODOS

O método utilizado foi mostrado anteriormente para medir com precisão a capacidade de *Proteus* para enxame sobre superfícies cateter. ⁶

Três 6F stents uretrais com propriedades incrustação resistente relatados foram seleccionados como materiais de teste: um stent de superfície de baixa-energia (LSE; Cozine Urological, Spencer, IN) ^{7,8}, um stent revestido-hidrogel (Percuflex; Boston Scientific Corporation, Watertown, MA) ^{9,10}, e um stent composto por silicone (Black Beauty; Cozine Urologia). 4 stents de teste foram cortadas em secções de 10 mm e colocados em fresco filtrado (0,2 m m) urina humana durante 24 horas a 37 ° C para permitir o desenvolvimento de uma película condicionado. Um canal central de 10 mm foi cortada de tripticase de soja agar (TSA) placas (Becton Dickinson e Co., Cockeysville, MD), e 10 mL de uma cultura de 4 horas de *P. mirabilis* 296 em TS caldo foi inoculada 5 mm da extremidade do canal central. A seguir à secagem de ar, secções do stent foram colocados como pontes entre o canal central adjacentes aos inoculos (Fig. 1). As placas foram incubadas aerobicamente a 37 ° C e examinadas em vários intervalos de

enxame das bactérias através das pontes de stent para as metades não inoculadas das placas. As experiências foram repetidas 20 vezes para cada stent de teste, e os tempos médios para cruzamento foram calculados. As diferenças nos tempos de passagem medianos foram testados com o teste de Kruskal-Wallis ANOVA one-way em fileiras e o teste de Mann-Whitney rank-sum utilizando programa SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Microscopia electrónica de varrimento (Hitachi S-4500) foi realizada em secções de stent para visualizar o organismo de teste, tanto na sua vegetativo e o seu estado enxame. ⁸

RESULTADOS

Enquanto isso (6 SD) para a migração de agentes patogénicos entre os três materiais de ensaio foi de 15,9 6 6.1, 19.8 6 9.5, e 29,7 6

14,3 horas para a superfície de baixa energia, de hidrogel revestidos, e stents de silicone, respectivamente. Kruskal-Wallis análise demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($P = 0,005$) entre os tempos de passagem de medianos dos vários stents. Um teste de Mann-Whitney determinou que havia diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de passagem da superfície de baixa energia ($P = 0,001$) e revestido-hidrogel ($P = 0,034$) em comparação com stents de silicone mas não entre a superfície de baixa energia e os stents revestidos de hidrogel ($P = 0,387$) (Tabela 1). A microscopia electrónica de varrimento demonstrou a presença de curto preswarming (Fig. 2) e alongado enxame (Fig. 3) formas de *P. mirabilis*.

DISCUSSÃO

Apesar dos avanços na concepção e biomateriais composição, os problemas de infecção e incrustação relacionadas com os stents uretrais e outros biomateriais colocados no interior do tracto urinário continuam por resolver. O medo de ligações de infecção de dispositivo de conexo para o uso indiscriminado de antibióticos profiláticos, enquanto infecção real e as incrustações são complicações comuns, que causam significativa morbidade, e são os principais factores limitantes na utilização a longo prazo de biomateriais dentro do tracto urinário. ¹¹

Numerosos estudos têm documentado incrustação significativo sobre stents ureteral recuperados. Por exemplo, El-Faqih e associados ¹²

notar-se que os stents de 141 recuperados submetidos a testes para a desobstrução do lúmen arterial, 46,8% apresentaram bloqueio intransponível com depósitos incrustantes. obstrução despercebido pode levar a pielonefrite, septicemia e choque. colonização microbiana stent é frequente, com taxas que variam de 28% a 90%. ^{13,14} Tal colonização bacteriana de dispositivos internos podem ocorrer em poucas horas, ¹⁵ e a administração de tratamento profilático antibiótico não impede a aderência bacteriana. ¹⁶ Além disso, a remoção de materiais fortemente incrustado pode ferir o tracto urinário e implicam mul-

T CAPAZ 1. M IGRATION DE *P. mirabilis* 296 ATRAVÉS V IVERSOS VOCÊ RETERAL S BARRACAS

stent	tempo de migração (hora 6 SD)	Intervalo (horas)	P valor em comparação com silicone
Silicone (Black Beauty)	29,7 6 14,3	8-48	-
Hidrogel revestido (Percuflex)	19,8 6 9,5	9-36	0,034
baixa energia de superfície (LSE)	15,9 6 6.1	6-24	0,001

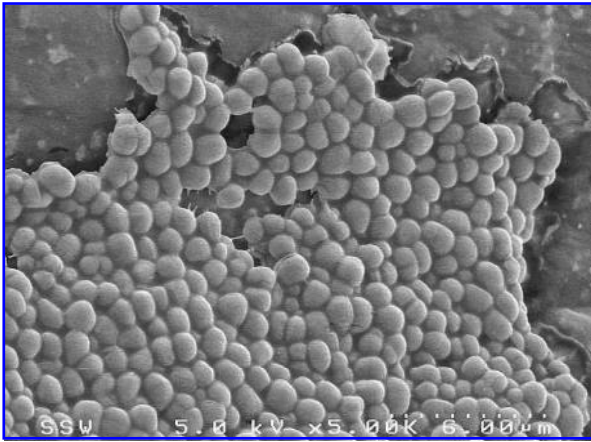


FIG. 2. micrografia eletrônica demonstrando curta vegetativo *Proteu* bactérias na superfície do stent anteriores para enxame.

tiples procedimentos cirúrgicos, incluindo ureteroscopy, litotripsia, técnicas percutânea, e, ocasionalmente, a extracção de cirurgia aberta ou nefrectomia. 17

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que *P.*

mirabilis desempenha um papel dominante nos processos de incrustação. 18

A microscopia electrónica de varrimento confirmou a presença de tais bactérias dentro de biofilmes de cateteres incrustados. 7 *Proteus mirabilis*, um móvels bactéria Gram-negativa, expressa fatores de virulência distintos que explicam o seu papel onipresente na infecção biomaterialrelated e incrustação. A enzima urease de *P. mirabilis* hidrolisa ureia de 6 a 10 vezes mais rápido do que as enzimas urease de outras espécies. 19 A presença de exopolissacárido, ou glicocálice, facilita a adesão de células bacterianas para o tecido ou superfie do biomaterial. O biofilme resultante protege as bactérias contra os antibióticos, anticorpos, e inibidores da urease, bem como as defesas do hospedeiro. 20 Além disso, pensa-se que a ligao o auxílio substâncias exopolymeric e nucleação dos cristais de estruvite que resultam da actividade da urease. 21 *Proteus mirabilis* também produz as fimbrias de quatro tipos diferentes e uma proteína de adesão distinto, denominado adesina celular uroepiteliais (UCA), que são vitais para a fixação dos bacilos às células uroepiteliais. 22 Hemolisinas e IgA-proteases ainda ajuda na protecção contra as defesas mediados pelo hospedeiro. Por último, *Proteu* bacilos são bactérias dimórficas. Quando cultivada num meio líquido, estas células medem 1,0 a 2,0 *m* m de comprimento, tem de 6 a 10 flagelos por célula, e comportamento de exibição natação (Fig. 2). Quando transferidos para um meio sólido, *Proteu* bacilos submeter morfogenese de culas swarmer: grandes multinucleadas hastes 20 a 80 *m* m de comprimento (Fig. 3), acompanhada por um de 50 a 500 vezes no aumento do número de flagelos. 22 Este tipo de crescimento é denominado o "fenómeno swarming" e é pensado para facilitar a colonização, translocação, e divulgação do *Proteu* bactéria. Mais crucial para o processo de incrustação, a diferenciação em Swarmer é acompanhada por um aumento de 30 vezes na produção de urease. 5

Na urina infectadas com *Proteus*, o mecanismo de incrustação é idêntico para a formação de pedras urinárias infectadas, envolvendo alcalinização urina resultante da hidrólise de ureia por organismos produtoras de urease. 23 Em poucas horas após a colocação no interior do tracto urinário, um filme de condicionamento composto por variá-

ous urinário proteínas e solutos reveste a superfície de um dispositivo. Estas moléculas e solutos proporcionar locais de ligação para as bactérias que, subsequentemente, se ligam à superfície. bactérias produtoras de urease aderir ao biofilme, se multiplicam, e elevar o pH urinário. De magnésio e de cálcio precipitado no ambiente alcalino produzido pela hidrólise de ureia, formação de estruvite ($MgNH_4 PO_4 \cdot 6H_2 O$) e carbonato de apatite ($Ca_{10} PO_4 \cdot 6 CO_2$).

As interações envolvidas na incrustação de biomateriais são numerosos e parecem ser influenciadas pelo seguinte: a composição química do polímero, as propriedades físicas da sua superfície, a presença de um polímero de enxerto do revestimento que confere a natureza biomaterial um hidrofílico / hidrofóbico, o tempo de contacto com a urina, o teor de soluto na urina, doenças metabólicas, e mesmo a composio microbiana intestinal. 4 O desenvolvimento de polímeros e várias modificações de superfície que são mais resistentes à incrustação representam possíveis abordagens para resolver este problema complexo. Três stents ureterais disponíveis comercialmente com potenciais propriedades incrustação de resistência foram testados neste estudo. Silicene foi usado principalmente no fabrico de stents ureterais. Composto de átomos alternados de silício e oxigénio, de silicene mantém-se o padrão de ouro para compatibilidade com o tecido devido à sua natureza não tóxico e inerte. 11

Existente evidência apoia a sua relativa resistência à incrustação, permitindo uma possível retenção dispositivo prolongado em comparação com outros materiais correntemente utilizados. 24 25 revestimentos de hidrogel constituído por polímeros hidrófilos que incham no contacto com água e reter uma grande fracção desta água dentro da sua estrutura polianico. A água de superfície de um material de hidrogel reduz o seu coeficiente de atrito, que não só melhora a facilidade de inserção do stent 26 mas também contribui para a redução da irrritação biocompatibilidade por fricção e adesão celular na interface biomaterial-urotelial. 27 Isto baixa a tensão interfacial pode explicar a capacidade de hidrogéis para resistir à proteína e deposição cristalóide nas suas superfícies. O stent de superfície de baixa-energia (LSE) foi concebido por implantação iónica. Alega-se que o dispositivo rica em carbono tem propriedades de baixa fricção e uma energia superficial (27,9 dines cm^{-2}) recomendada para a resistência microbiana. 28 estudos que

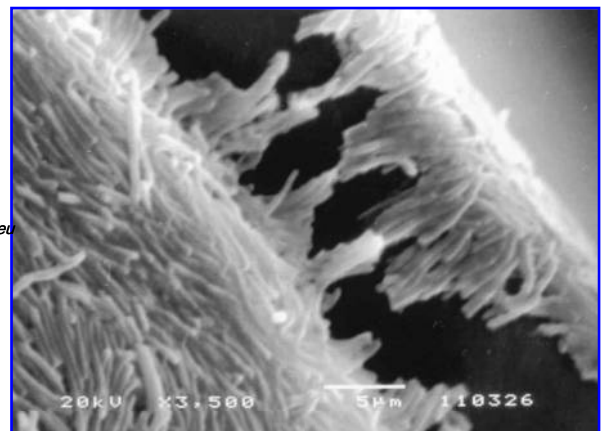


FIG. 3. Seguindo a diferenciação em células swarmer hiperflagelated extremamente alongadas, organismos alinhar estreitamente ao longo dos seus eixos, formando jangadas bidimensionais que migram através de uma acção coordenada dentro flagelar polissacarídeo hidratado secretados pela bactéria. digitalização representante de elétrons gráficos micro de swarming *Proteu* sobre a superfície do cateter são mostrados.

um stent em comparação com stents baixo surfaceenergy à base de silicone e ricos em carbono obtidos a partir de doentes tratados para a doença de pedra mostrou significativamente menos incrustação sobre os stents baixas surfaceenergy. 8,29

Avaliação de incrustação sobre os vários stents e cateteres depende microscópicas de superfície e de técnicas analíticas avançadas, tais como espectroscopia de raios-X fotoeletrônica, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e análise de raios-X de energia dispersiva 30 bem como controlada *em vitro* testes de incrustação. 31 Incrustação pode ser quantificada utilizando uma variedade de métodos, incluindo a medição do peso seco e de cálcio espectroscopia de absorção atômica. 31 No entanto, nenhuma destas técnicas mede a interação directa entre o microorganismo e do stent. Use desta simples *em vitro* modelo permite que um investigador de avaliar rapidamente a interação de *P. mirabilis* com vários biomateriais do tracto urinário. O tempo para a migração de *P. mirabilis* 296 em toda a superfície de um cateter ureteral é uma medida indirecta da capacidade do organismo para se ligar a e atravessar uma superfície. O modelo, desenvolvido por Stickler e associados, 6 demonstrou anteriormente diferenças significativas na capacidade de *P. mirabilis* para translocar através de vários cateteres uretrais. Swarms foram mostrados para migrar significativamente mais rápido através de cateteres revestidos de hidrogel hidrófilo do que através de cateteres de silicone hidrofóbicos. 6 No presente estudo, descobrimos que o tempo para a migração de *P. mirabilis* foi de 50% (*P* 5 0,034) e 87% (*P* 5 0,001) mais longo para os stents revestidos de silicone do que para a de hidrogel e de superfície de baixa-energia stents, respectivamente. Os resultados de resistência em relação apoio adicional de silicone *Proteu*

translocação em comparação com outros polímeros. Porque a ligação resultante, diferenciação em Swarms, e a migração de *P. mirabilis* através da superfície de um dispositivo de infecção do tracto urinário promove biomaterial-relacionadas e incrustação, caracterização adicional da capacidade de um dispositivo para retardar a migração de *Proteu* pode fornecer novos insights sobre o desenvolvimento biomaterial. Por último, de acordo com estes resultados, o uso de stents de silicone pode ser benéfica em pacientes com a longo prazo habita cateter ureteral que estão em risco de recorrência *Proteu* infecções e posterior incrustação stent.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Gavin Hughes, Escola de Cardiff de Biociências, Universidade de Cardiff, para contribuir a micrografia eletrônica de varredura de *Proteus mirabilis* enxame através de uma superfície do cateter. Além disso, graças ao pessoal na superfície Ciência Ocidental, Universidade de Western Ontario, por sua ajuda com este projeto.

REFERÊNCIAS

- Choong SK, Whitfield HN. Incrustação urinária de materiais aloplásticos. *J Endourol* 2000; 14: 19.
- Morris NS, Stickler DJ. O efeito de inibidores da urease na incrustação de cateteres uretrais. *Urol* 1998; 26: 275.
- Mobley HL, Belas R. Swarming e patogenicidade de *Proteus mirabilis* no tracto urinário. *Trends Microbiol* 1995; 3: 280.
- Sofer H, Denstedt JD. Incrustação de biomateriais no tracto urinário. *Curr Opin Urol* 2000; 10: 563.
- Falkinham JO III, Hoffman PS. Único desenvolvimento ca-
- ticas do enxame e células de curtas *Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol*, 1984; 158: 1037.
- Stickler D, G. Hughes Capacidade de *Proteus mirabilis* a pulular sobre cateteres uretral. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 206.
- Reid G, Tieszer C, Denstedt JD, et al. Exame de deposição bacteriana e incrustação em stents ureteral de diferentes propriedades de superfície, após o que habita em seres humanos. *Coll Surf B: Biointerfaces* 1995; 5: 171.
- Tieszer C, Reid G, Denstedt JD. XPS e SEM de detecção de alterações de superfície sobre 64 stents ureteral após uso humano. *J Biomed Mater Res* 1998; 43: 321.
- Gorman SP, Tunney MM, Keane, PF, et al. Caracterização e avaliação de um (óxido de etileno) poli romance / hidrogel composta de poliuretano (Aquavene) como um stent uretral biomaterial. *J Biomed Mater Res* 1998/03/15; 39: 642.
- Kuilk E, Y. Ikada na adesão de plaquetas in vitro de hidrogéis não iônicos e iônicos com diferentes teores de água. *J Biomed Mater Res* 1996; 30: 295.
- Denstedt JD, Wollin TA, Reid G. Biomateriais utilizados na urologia: questões atuais de biocompatibilidade, infecção e incrustação. *J Endourol* 1998; 12: 493.
- El Faqih SR, Shamsuddin AB, Chakrabarti, A. et al. Poliuretano stents uretrais internos no tratamento de pacientes de pedra: A morbidade relacionada com habita vezes. *J Urol* 1991; 146: 1487.
- Keane PF, Bonner MC, Johnston SR, et al. Caracterização de biofilme e incrustação em stents uretéricos in vivo. *Br J Urol* 1994; 73: 687.
- Reid G, Denstedt JD, Kang YS, et al. adesão microbiana e a formação de biofilme sobre os stents uretrais in vitro e in vivo. *J Urol* 1992; 148: 1592.
- Gorman SP. aderência microbiana e produção de biofilme. Em: *Mecanismos e Ação de Química biocidas*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991, pp 271-295.
- Lifshitz DA, Winkler HZ, Gross H, et al. valor preditivo de culturas urinário na avaliação da colonização microbiana de stents ureteral. *J Endourol* 1999; 13: 735.
- Mohan-Pillai K, Keeley FX Jr, Moussa SA, et al. gestão endourologia de stents ureteral severamente incrustados. *J Endourol* 1999; 13: 377.
- Liedl B. Cateter-associado infecções do tracto urinário. *Curr Opin Urol* 2001; 11: 75.
- Jones BD, Mobley HL. Diversidade genética e bioquímica de ureases de *Proteus, Providencia, e Morganella* espécies isoladas de infecção do tracto urinário. *Infect Immun* 1987; 55: 2198.
- McLean RJ, níquel JC, Cheng KJ, et al. A ecologia e patogenicidade de bactérias produtoras de urease no tracto urinário. *Crit Rev Microbiol* 1988; 16: 37.
- Gorman SP, Tunney MM. A avaliação do comportamento incrustação em biomateriais do trato urinário. *J Biomater Appl* 1997; 12: 136.
- Um Rozalski, Sidorczyk Z, Kotelko K. potenciais factores de virulência de *Proteu* bacilos. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997; 61: 65.
- Tunney MM, Jones DS, SP Gorman. Biofilme e incrustação biofilme-conexo de dispositivos do tracto urinário. *Methods Enzymol* 1999; 310: 558.
- V Srinivasan, Clark SS. Incrustação de materiais de cateteres in vitro. *J Urol* 1972; 108: 473.
- Kunin CM, Chin QF, Chambers S. A formação de incrustações em cateteres urinários nos idosos: "nonblockers" A comparação de diferentes tipos de materiais de cateteres em "bloqueadores" e *J Urol* 1987; 138: 899.
- Candela JV, Bellman GC. stents uretrais: Impacto do diâmetro e da composição sobre os sintomas do paciente. *J Endourol* 1997; 11: 45.
- Ratner BD, Hoffman AS. Os hidrogéis sintéticos para aplicações biomédicas. Cidade: Editora, 1976 pp____.
- Wollin TA, Tieszer C, Riddell JV, et al. formação de biofilme bacteriano, incrustação, e adsorção antibiótico para stents uretrais de demora em seres humanos. *J Endourol* 1998; 12: 101.

29. Tieszer C, Reid G, Denstedt JD. deposição de película condicionado em stents ureteral após o implante. J Urol 1998; 160: 876.
30. Reid G, Busscher HJ, Sharma S, et al. As propriedades de superfície de cateteres, stents e bactérias associadas com infecções do tracto urinário. Surf Sci Rep 1995; 21: 251.
31. Choong SK, madeira S, Whitfield HN. Um modelo de incrustação Quantify sobre os stents uretéricos, cateteres uretrais e polímeros destinados a serem utilizados urológico. BJU Int 2000; 86: 414.

Endereço reimpressão solicita a:
John D. Denstedt, MD
Divisão de Saúde Londres
Urologia do St. Joseph, Ontário.
Canadá N6A 4V2

O email: denstedt@uwo.ca

Este artigo foi citado por:

1. Ben H. Chew, Dirk Lange. 2009. sintomas cateter ureteral e infecções associadas: uma perspectiva biomateriais. *Nature Reviews Urologia* **6: 8**, 440-448. [[CrossRef](#)]
2. Matthew F. Copeland, Douglas B. Weibel. 2009. swarming bacteriana: um sistema modelo para estudar a dinâmica auto-montagem. *Matéria* **5: 6**, 1174. [[CrossRef](#)]
3. D. Lange, stents BH ChewUreteral: design e materiais 85-103. [[CrossRef](#)]
4. Ben H Chew, Mordechai Duvdevani, John D Denstedt. 2006. Novos desenvolvimentos em ureteral stent design, materiais e revestimentos. *Expert Review of Medical Devices* **3: 3**, 395-403. [[CrossRef](#)]
5. Greg L. Shaw, Simon K. Choong, Christopher Fry. 2005. Incrustação de biomateriais no tracto urinário. *Urologia Research* **33: 1**, 17-22. [[CrossRef](#)]
6. Ben H Chew, John D Denstedt. 2004. Tecnologia introspecção: novos materiais ureteral stent e desenhos. *Nature Clinical Practice Urologia* **1: 1**, 44-48. [[CrossRef](#)]