

ACINETOBACTER BAUMANNII, ESCHERICHIA COLI VE KLEBSIELLA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİNDE KULLANILABİLECEK KISA SÜRELİ "PULSED-FIELD GEL" ELEKTROFOREZ (PFGE) PROTOKOLÜ*

Rıza DURMAZ, Barış OTLU, Ahmet ÇALIŞKAN, Nafia GÜRSOY

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MALATYA

ÖZET

Bu yazıda birçok hastanedeki hastane infeksiyonlarından sıklıkla izole edilen *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin alttipendirmesinde kullanılmak üzere optimize edilmiş, hızlı ve ortak bir "pulsed-field" jel elektroforez (PFGE) protokolü sunulmuştur. Optimize edilen yöntem basit, tekrarlanabilir ve farklı bakteriler için kullanıma uygun bulunmuştur. Ayrıca süreyi kısaltması, kullanılan çözelti ve enzimlerin düşük hacimleriyle çalışılabilmesi nedeniyle, ekonomik olarak değerlendirilmiştir. Çalışılan bakterilere bağlı salgınları değerlendirme ve hastane infeksiyonlarının yaygınlık derecesi hakkında yararlı bilgiler sunma potansiyeli vardır. Optimize edilen bu protokol, farklı merkezlere ait PFGE sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırmasına olanak sağlayabilir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* türleri, moleküler tiplendirme, pulsed-field jel elektroforez

SUMMARY

A Rapid Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) Protocol Developed for Subtyping *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella* spp.

This paper provided information about a rapid pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocol optimized for subtyping of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella* spp. which are commonly isolated from nosocomial infections in many hospitals. The procedure was simple, reproducible and versatile. Furthermore it is likely cost-effective because of reducing time, reagent volumes and enzymes. It has potential to identify outbreaks and follow spreading degree of nosocomial infections caused by the tested bacterial strains. This optimized protocol can allow PFGE fingerprinting profiles of the isolates from different settings to be compared.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., molecular typing, pulsed-field gel electrophoresis

GİRİŞ

Acinetobacter baumannii, hastane ortamındaki lavabolar, ventilasyon cihazları, nemlendiriciler, hastalar ve sağlık personellerinin elleri

üzerinde uzun süre varlığını devam ettirebilen fırsatçı bir patojendir⁽³⁾. Birçok antibiyotiğe hızla direnç kazanan bu bakteri, başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere çeşitli birimlerde ciddi salgınlara sebep olabilmektedir^(3,5,12,15).

Yazışma adresi: Rıza Durmaz, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MALATYA

Tel.: (0422) 341 01 26, GSM: (0539) 229 56 91

e-posta: rdurmaz@inonu.edu.tr

Alındığı tarih: 31.05.2007, revizyon kabulü: 01.06.2007

* Bu yazı; TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu'nca desteklenen 106S211 (SBAG-3459) numaralı "Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Moleküler Tiplenmesinde Kullanılacak "Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)" Yöntemlerinin Standardizasyonu ve Kit Formatı Haline Getirilmesi -PulseNet- TÜRKİYE İçin Hazırlık" başlıklı proje kapsamında yapılan optimizasyon çalışmalarının sonuçlarını içermektedir.

Escherichia coli ve *Klebsiella* türlerinin antibiyotiklere dirençli suşları, başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere, hastanelerin birçok servisinde giderek artan oranlarda infeksiyonlardan izole edilmektedir^(1,7,9). Bu bakterilerin klonal yayılımına bağlı olarak gelişmiş birçok salgın gösterilmiştir^(4,7).

Moleküler tiplendirme yöntemleri kökenler arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koyarak, salgınların kaynak, bulaş yolları ve bulaşın derecesi hakkında oldukça yararlı bilgiler sunmaktadır. Bakteriler arasındaki klonal ilişkiyi araştırmada farklı moleküler tiplendirme yöntemleri denenmektedir⁽¹¹⁾. Bunlar arasında ayırım gücü en yüksek olan "pulsed-field jel elektroforez (PFGE)" yöntemidir^(10,11). Altın standart olarak kabul edilen bu yöntemin, en önemli dezavantajı, farklı laboratuvarlarda değişik protokollerin uygulanması nedeniyle sonuçların birbirleriyle kıyaslanma olanağının olmamasıdır. İkinci önemli sorun ise klasik PFGE protokollerinin 3-4 gün gibi uzun sürede sonuçlanmasıdır⁽⁶⁾. Araştırmacılar bu iki majör sorunu gidermek üzere yoğun çaba harcamaktadırlar. Birçok bakteri türünün moleküler tiplendirmesinde kullanılacak, kısa sürede sonuçlanan ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilen sonuçlar alınabilecek PFGE protokolleri üzerinde çalışılmaktadır^(2,8,10,14).

Laboratuvarımızda, TÜBİTAK tarafından desteklenen 106S211 (SBAG-3459) nolu proje kapsamında *A.baumannii*, *E.coli* ve *Klebsiella* türlerinin klonal ilişkisinin belirlenmesinde kullanılacak kısa süreli, ortak bir PFGE protokolü geliştirilmiştir. Bu yazıda protokolün ayrıntıları sunulmuştur.

YÖNTEM

PFGE yöntemi; agaroz içine gömülü haldeki bakteriden, yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen kromozomun, restriksiyon enzimi (RE) ile kesim profilinin belirlenmesi esasına dayanır. Yöntemde başlıca şu aşamalar bulunmaktadır: Çalışılacak bakterilerin hazırlanması, bakterilerin agarozla karıştırılması, agaroz içindeki bakterilerin parçalanması (in situ lysis), agaroz içindeki kromozomun saflaştırılması,

masası, agaroz içindeki kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesilmesi (in situ-digestion), elektroforezle DNA parçalarının ayrıştırılması, DNA bantların görünür hale getirilmesi ve sonuçların yorumlanması⁽⁶⁾.

A. İzolatların hazırlanması^(2,14):

1. Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapılır.
2. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edilir.
3. Buradaki tek koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakılır.
4. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8.0) içinde süspansiyon edilir.
5. Hücre süspansiyonu, 2500 x g'de, 4°C'de, 15 dakika (alternatif olarak 13.000 x g'de, 4°C'de, 2 dakika) santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılır.
6. Peletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapılır.
7. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlanır. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agarozla gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletilir.

B. İzolatların agarozla gömülmesi^(2,14):

1. HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısıyla agaroz (Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlanır.
 - 0.50 g agaroz, 100 ml'lik balona konur.
 - Üzerine 23.5 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.
 - Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır. Tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırında tutulur. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlanır.

- Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konur.
- % 20'lik sodyum dodezil sülfattan (50°C'de ısıtılmış) 1.25 ml eklenerek iyice karıştırılır.
- Agaroz-SDS karışımından 200 µl Ependorf tüplere dağıtılır ve 45-50°C'deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bekletilir.
2. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtulur.
3. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısıly agaroz-SDS bulunan tüpe eklenir. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanır.
4. Bekletilmeden, hücre-agaroz-SDS karışımından -hava kabarcığı olmayacak şekilde- agaroz kalıbına (10 mm x 5 mm x 1.5 mm, Bio Rad Laboratories) 100 µl dağıtılır.
5. Kalıplar, agaroz katılaşmıcaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletilir. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlanmaktadır.

C. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması⁽¹⁴⁾:

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre liziz solüsyon I (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konur.
2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak liziz solüsyonuna yerleştirilir.
3. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir (Not: Tüp su banyosuna hafif yatık pozisyonda yerleştirilir).
4. Liziz solüsyon I dökülerek, yerine 0.5 ml hücre liziz solüsyon II (0.5 M EDTA, % 1 sarkozil, 400 µg/ml proteinaz K) konur.
5. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir.

D-Hücre lizizinden sonra agaroz kalıplarının yıkanması^(2,14):

1. Liziz aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15

2. dakika bekletilir.
2. Dikkatlice liziz solüsyonu II aspire edilir.
3. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 50°C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletilir (su ile yıkama işlemi).
4. Su tamamen aspire edilir. Üçüncü maddede belirtilen su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlanır. Su tamamen aspire edilir.
5. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) tamponuyla yıkanır (Not: Yıkama sonrası agaroz kalıplar şeffaflaşır).
6. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş olur.

E. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi:

A.baumannii için etkinliğı daha önce araştırılmış olan *ApaI*^(3,10,15), *E.coli* ve *Klebsiella* spp için *XbaI*^(1,4,6) enzimi kullanılmıştır.

A.baumannii DNA'sını içeren kalıpların *ApaI* RE ile kesimi:

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/4 oranında kesilir. Parçalardan biri, 100 µl 1x *ApaI* tamponu içine konarak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletilir (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklanır). Sonra sıvı aspire edilir.
2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır:
 - 10 µl 10x *ApaI* tamponu
 - 3 µl *ApaI* enzimi (10 U/µl)
(Promega Corporation, WI, USA)
 - 1 µl BSA (10 µg/µl)
 - 86 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)
 - Toplam hacim 100 µl.
3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edilir⁽³⁾.
4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilir.
5. Kalıplar elektroforez için hazırdır.

E.coli ve Klebsiella bakterilerinin DNA'sını içeren kalıpların XbaI RE ile kesimi:

A.baumannii'deki işlemler aynen tekrarlanır. Farklı olarak: *XbaI* (20 U/örnek) enzimi (Promega Corporation, WI, USA) ve onun tamponu kullanılır.

E. Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi⁽²⁾:

1. 0.5 x TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde 100 ml olacak şekilde % 1'lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlanır.
 - i. 1 g "pulsed-field certified agarose" 200 ml'lik balona konur.
 - ii. Üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.
 - iii. Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutulur.
 - iv. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konur.
2. Agaroz dökülecek kaset hazırlanır, sızdırmaması için etrafı bantlanır. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konur.
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirilir. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklenir.
4. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınır. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilir.
5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine dökülür.
6. Oda ısısında 20-30 dakika katılaşmaya bırakılır. Tarak dikkatlice çıkarılır. İstenirse çukurlar % 1'lik agarozla doldurulabilir.
7. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900-2000 ml

0.5 x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilir.

F. Elektroforez:

Her üç bakteri için aynı elektroforez koşulları uygulanır. CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları: Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat.

G. Sonucun gözlenmesi ve analizi:

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınır. 20 dakika boyanır.
2. UV ışığa altında görüntülenir.
3. *Gel logic 2200 imaging system* (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilir. Resimler TIFF formatında kaydedilir.
4. GelCompar II yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edilir. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapılır. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak PFGE profillerinin, dendrogramı oluşturulur ve kümeleşme analizi yapılır. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlenir. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1-1.5 olarak alınır^(10,15).
5. Tenover ve ark.⁽¹³⁾ tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirilir.
 - *Aynı izolatlar:* Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidir.
 - *Yakın ilişkili izolatlar:* Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı vardır. Büyük bir olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.
 - *Muhtemel ilişkili izolatlar:* Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhte-

melen salgınla ilişkilidirler.

- *İlişkiziz izolatlar*: Aralarında ≥ 7 bant farkı olan suşlar salgınla ilişkileri bulunmayan suşlardır.

Yaptığımız optimizasyon çalışmaları sonucunda:

1. *E.coli*, *Klebsiella* spp. ve *A.baumannii* için ortak kalıp hazırlama, kalıptaki bakterilerin parçalanması ve kalıpların yıkanması aşamalarında kullanılacak ortak protokol oluşturulmuştur.
2. *A.baumannii*, *Klebsiella* spp. ve *E.coli* bakterilerinin tiplendirilmesinde kullanılabilecek ortak ve çalışmanın ertesini günü sonuç alınabilen kısa süreli bir protokol geliştirilmiştir.
3. Literatürde *ApaI* enzimi için örnek başına önerilen 60 U yerine 30 U, 40 U *XbaI* yerine 20 U'nin yeterli olduğu saptanmıştır.
4. Literatürde kullanılan 4 ml hücre liziz tamponu yerine, 500 µl'lik hacmin de etkili olduğu bildirilmiştir.
5. Geliştirilen protokolün laboratuvar içi tekrarlanabilirliği test edilmiştir.

TEŞEKKÜR: Proje desteği için TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A et al: Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, *J Antimicrob Chemother* 2006;57(5):979-82.
2. Centers for Disease Control and Prevention: Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf.
3. Guducuoglu H, Durmaz R, Yaman G, Cizmeci Z, Berktaş M, Durmaz B: Spread of a single clone *Acinetobacter baumannii* strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey, *New Microbiol* 2005;28(4):337-43.
4. Mamlouk K, Boutiba-Ben Boubaker I, Gautier V et al: Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital, *J Clin*

- Microbiol* 2006;44(11):4049-56.
5. Maslow JN, Glaze T, Adams P, Lataillade M: Concurrent outbreak of multidrug-resistant and susceptible subclones of *Acinetobacter baumannii* affecting different wards of a single hospital, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26(1):69-75.
6. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD: Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, "Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*" kitabında s.563-72, ASM Press, Washington DC (1993).
7. Naseer U, Natas OB, Haldorsen BC et al: Nosocomial outbreak of CTX-M-15-producing *E.coli* in Norway, *APMIS* 2007;115(2):120-6.
8. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ: Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*, *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1889-94.
9. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L et al: Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control, *Clin Infect Dis* 2006;42(1):37-45.
10. Seifert H, Dolzani L, Bressan R et al: Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*, *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4328-35.
11. Seifert H, Gerner-Smidt P: Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates, *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1402-7.
12. Stephens C, Francis SJ, Abell V, DiPersio JR, Wells P: Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital, *Am J Infect Control* 2007;35(4):212-5.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America, *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18(6):426-39.
14. Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A: Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci, *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4242-5.
15. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A et al: Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy, *Clin Microbiol Infect* 2007;13(5):481-9.