

Standardisierte Pulsfeld-Gel-Elektrophorese mit dem GenePath Strain Typing System® zum DNA-Fingerprinting bei nosokomialen Infektionen

Standardized pulsed-field gel electrophoresis by the GenePath Strain Typing® system for DNA-fingerprinting in nosocomial infections

F.-J. Schmitz^{1,3}, R. Geisel¹, S. Wagner¹, H.P. Heinz¹, H. Idel², U. Hadding¹

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die praktischen Einsatzmöglichkeiten des neuen GenePath Strain Typing Systems® zum molekularbiologischen DNA-Fingerprinting an verschiedenen Bakterien-Stämmen untersucht, die zum großen Teil im Verlauf nosokomialer Infektionen isoliert wurden. Mittels kommerziell erhältlicher Reagenziensätze, die neben den gebrauchsfertigen Restriktionsenzymen, Proteinasen, Puffern und Kulturmedien auch Agarose sowie Kultur- und Restriktionskontrollproben enthalten, ist eine standardisierte Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) für die klonale Analyse von Erregern bei diagnostischen und epidemiologischen Fragestellungen möglich. Die im Rahmen der Evaluierung durchgeführten Experimente zur Intra- und Inter-Assay-Varianz zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Innerhalb von 3 Tagen können mit dieser Makrorestriktionsanalyse Aussagen über die klonale Beziehung verschiedener Bakterien-Isolate zueinander getroffen werden. Die Handhabung des Systems sowie die Auswertung und Dokumentation der Bandenmuster auf dem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel ist einfach und schnell zu erlernen. Anhand von Bandenmustern wird in dieser Untersuchung der Nachweis von nosokomialen Infektionen durch die klonale Identität von Bakterien-Isolaten erbracht.

Schlüsselwörter

Bakterientypisierung – Pulsfeld-Gel-Elektrophorese – nosokomiale Infektionen – Infektionsepidemiologie

Summary

In the present investigation the practical application possibilities of the new GenePath Strain Typing System® for molecular biological DNA finger printing were demonstrated by the analysis of different bacterial strains, most of them isolated during the course of nosocomial infections. By commercially available reagent-sets, including restriction enzymes, proteinases, buffer and culture media as well as agarose, control plugs and control cultures, a standardized pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for the clonal differentiation of bacteria for diagnostic and epidemiological purposes is possible. The study of intra- and inter-assay precision showed the satisfying reproducibility of the results. Within three days the clonal relationship among various bacterial isolates can be proved by this form of macrorestriction analysis. System handling, application of the reagents as well as documentation and interpretation of the restriction fragment patterns on the ethidium bromide stained gels are pretty simple and easy to learn. Pictures of stained restriction fragment patterns show the clonal identity of isolated bacteria and give by this way evidence for nosocomial infections.

Key words

bacterial typing – pulsed-field gel electrophoresis – nosocomial infections – infection epidemiology

¹ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie (Direktor: Prof. Dr. U. Hadding) und

² Institut für Hygiene, (Direktorin: Frau Prof. Dr. H. Idel) der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Korrespondenzanschrift:

³ Dr. med. F.-J. Schmitz
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Universitätsstraße 1, D-40225 Düsseldorf
Fax: x-49-211-311-5323

Einleitung

Nosokomiale Infektionen sind eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität im Krankenhaus. In den USA kommt es bei 5,7 % stationär behandelter Patienten zum Ausbruch einer nosokomialen Infektion [1]. Die Verhältnisse dürften in Deutschland vergleichbar sein, so daß sich die Zahl der während eines stationären Aufenthaltes akquirierten Erkrankungen in einer Größenordnung von 500000 bis zu 1 Million pro Jahr bewegt [2]. Eine Aufdeckung von Ansteckungsquellen und -wegen erfordert zunehmend den Einsatz experimenteller Methoden. Dabei steht die Frage nach der klonalen Identität verschiedener Bakterien-Isolate aus einem Infektionsgeschehen im Mittelpunkt des Interesses. Die Klärung dieser epidemiologischen Frage ermöglicht eine Aussage über mögliche nosokomiale Infektionen, aber auch über die Effizienz einer Antibiotika-Therapie. Dies soll an drei Beispielen verdeutlicht werden:

- Auf einer chirurgischen Intensivstation werden in unterschiedlichsten Untersuchungsmaterialien Oxacillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme isoliert. Handelt es sich hier um eine nosokomiale Infektion?
- Bei einem Patienten wird bei stationärer Neuaufnahme aus dem Urin *Klebsiella oxytoca* isoliert, obwohl erst vor zwei Wochen bei demselben Patienten ein solcher Keim isoliert und antibiotisch behandelt wurde. Liegt eine Neuinfektion mit einem zweiten Keim vor? Ist es eine Reinfektion mit dem ersten Keim auf dem Boden einer Immunschwäche des Patienten oder ist eine nicht optimale Antibiotikatherapie der Grund für die Keim-Persistenz?
- Einem Patienten wurde eine prothetische Herzklappe aus Kunststoff implantiert, und er fiebert. Aus mehreren Blutkulturen können *Staphylococcus epidermidis*-Stämme isoliert werden mit graduell unterschiedlicher Antibiotika-Resistenz. Haben diese Koagulase-negative Staphylokokken eine klonale Identität mit pathogenetischer Bedeutung, oder handelt es sich um sekundäre Verunreinigungen durch Hautkeime?

Um diese Fragen beantworten zu können, ist eine zuverlässige Bakterien-Typisierung notwendig. Im Laufe der vergangenen Jahre wurden zunehmend genotypische Methoden zur Erregertypisierung eingesetzt, da die phänotypische Charakterisierung, aufgrund z. B. der Lysotypie, gleicher biochemischer Reaktionen, der Serotypie und des Resistenzverhaltens gegenüber Antibiotika heute nicht mehr ausreicht, um präzise und fundierte epi-

demologische Untersuchungen durchzuführen [3, 4, 5, 6]. Mehrere genotypische Methoden stehen für die molekularbiologische Typisierung von Infektionserregern zur Verfügung, z. B. die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE), Restriktionslängenpolymorphismen, Ribotypisierung und nicht-stringente-Polymerasekettenreaktion mit universellen Primersequenzen. Von mehreren Autoren wurde die hohe Diskriminationsfähigkeit der PFGE-Methode bei verschiedenen Infektionserregern hervorgehoben [3, 4, 7], so daß die PFGE häufig als „Golden Standard“ der molekularen Epidemiologie bezeichnet wird. Allerdings ließen bisher das Handling und die Reproduzierbarkeit aufgrund nicht standardisierter Reagenzien und unterschiedlicher Versuchsbedingungen häufig zu wünschen übrig.

Bei der hier vorgestellten Form der Makrorestriktionsanalyse werden Bakterienzellen in Agarose-Blöckchen eingebettet und mit Detergenzien und Proteinase aufgeschlossen. Das intakte Bakterienchromosom ist durch die Gelmatrix gegen Scherbruch geschützt und kann mit selten schneidenden Restriktionsenzymen in 15–20 Fragmente definierter Länge (50–1000 Kilobasen) gespalten werden. Anschließend erfolgt eine Elektrophorese im Agarose-Gel. Das Ergebnis sind Bandenmuster der DNA-Fragmente („DNA-Fingerprints“) des jeweiligen Bakteriums. Anhand des Vergleiches mehrerer Fingerprints kann entschieden werden, ob die untersuchten Bakterien-Isolate verschieden, genetisch ähnlich oder von klonaler Identität sind.

Mit dem neu entwickelten GenePath Strain Typing System® ist nun, laut Hersteller, eine standardisierte und gut reproduzierbare PFGE möglich. Während bei den bisherigen Systemen zur PFGE die Reagenzien und Versuchsbedingungen vom Benutzer z. T. selbst hergestellt bzw. ausgearbeitet werden mußten, liegen jetzt konfektionierte Reagenziensätze vor, die laut Hersteller eine Chargenkonstanz aufweisen sollen. Die zu verwenden optimalen und spezifischen PFGE-Programme sind für die einzelnen Bakterienspezies im Gerät fest eingespeichert. Die dem GenePath Strain Typing System® zugrunde liegende Technik ist die Pulsfeld Methode CHEF (Contoured Clamp Homogenous Electric Field). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung sollte die praktische Handhabbarkeit des Systems sowie seine Zuverlässigkeit untersucht und der Einsatz bei epidemiologischen Fragestellungen getestet werden.

Material und Methoden

Arbeitsablauf beim Arbeiten mit dem GenePath Strain Typing System®

Die zu testenden Proben werden über Nacht auf einem geeigneten Medium (z. B. Blutagar) kultiviert. Hieraus wird eine einzelne Kolonie in ein Kulturröhrchen mit spezifischen Medien (z. B. Brain-Heart-Infusion bei Sta-

Abkürzungen:

PFGE	Pulsfeld-Gel-Elektrophorese
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> Stämme

phylokokken, Luria Bertani-Medium bei Enterobacter) überimpft und 16–20 Stunden bei 37° C in einem Schüttelinkubator bebrütet. Das Zellwachstum kann durch Bestimmung der optischen Dichte des Ansatzes photometrisch kontrolliert werden. Ca. 5×10^8 Zellen/ml werden in ein Agarose-Blöckchen eingebettet und in situ mit Detergenzien, Proteasen und Lysozym lysiert und entproteinisiert. Das intakte Bakterienchromosom ist in der Agarosematrix vor Scherkräften geschützt, wodurch u. a. die Handhabung der Probe vereinfacht wird. Damit können vor Beginn der Elektrophorese die DNA-Agaroseblöcke leicht in die vorgesehenen Probenvertiefungen im Gel eingelegt werden. Für das GenePath Strain Typing System® wurden nun 4 spezielle Reagenziensätze entwickelt, die für unterschiedliche Bakterien spezifische Restriktionsendonukleasen, optimierte Puffer und spezielle Proteinasen enthalten. Hierdurch sollen für die verschiedensten Keime bestmögliche Bedingungen für eine PFGE-Auftrennung zur Verfügung stehen (Einzelheiten siehe unten). Die in den Kits eingesetzten, selten schneidenden Restriktionsendonukleasen erzeugen 10–20 Fragmente je Bakterienchromosom. Bei gram-positiven Bakterien, die viele Adenin- und Thymin-Basen in ihrer DNA enthalten, wird z. B. die Restriktionsendonuklease *Sma* I eingesetzt, welche die folgende DNA-Sequenz CCCGGG erkennt und entsprechend relativ wenig (< 20) DNA-Fragmente durch Restriktion herstellt. Analog enthält das Chromosom der gram-negativen Bakterien viele Guanin- und Cytosin-Basen, so daß im Kit Nr 3 für Enterobacter und Pseudomonas die Restriktionsendonuklease *Spe* I verwandt wird. *Spe* I erkennt die Sequenz ACTAGT. Aus den Schnittstücken der Restriktionsenzyme resultieren 10–20 unterschiedliche Fragmente, die dann mittels PFGE aufgetrennt werden. Die separierten Fragmente werden durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das resultierende Bandenmuster wird für die genetische Identifikation der Erreger herangezogen. Pro Gel stehen Spuren für 15 Proben zur Verfügung, wobei in jedem Gel mindestens eine Kultur-Kontrolle, eine Restriktions-Kontrolle (sog. Kontroll-Block) und ein bis zwei DNA-Größenstandards (z. B. Lambda Ladder- und Saccharomyces cerevisiae-Standard) mitgeführt werden sollten. Die Kultur-Kontrolle wird eingesetzt, um die Probenvorbereitung über Kultivierung, Herstellung der Agarose-Blöcke bis hin zum Einsatz der Restriktionsenzyme zu überprüfen. Wird diese Kontrolle zusammen mit dem Kontroll-Block (Restriktionskontrolle) eingesetzt, kann man sicher sein, daß sowohl die Herstellung der Blöcke als auch die Aufspaltung des Genoms durch die Restriktionsenzyme korrekt durchgeführt wurde.

Die Gesamtdauer des Ansatzes, beginnend mit der Kultur und endend mit dem Dokumentationsphoto, dauert ca. 58 Stunden. Dies ist die Maximalzeit, welche zur besten Bandentrennung führt. Mit dem Gerät ist allerdings auch ein sog. "Screen Mode" möglich, bei dem die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente nur 4 statt 20 Stunden dauert. Dadurch erhält man natürlich

schneller Informationen über eine mögliche klonale Identität der untersuchten Keime, doch geht diese Prozedur eindeutig auf Kosten der guten und sauberen Bandentrennung.

Auflistung der verwendeten Reagenzien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Reagenzien aus dem Kit Nr. 1 (für ORSA-Stämme) bzw. Nr. 3 (für Enterobacter cloacae- und Klebsiella pneumoniae-Isolate) gearbeitet. Sofern vom Hersteller deklariert, werden die in dem jeweiligen Kit enthaltenen Reagenzien mit Angaben über Zusammensetzung und Konzentration aufgeführt.

Reagenzien aus Kit Nr.1:

Zellsuspensionspuffer
CleanCut Agarose (2 %)
BHI (Brain Heart Infusion) Medium
Lysepuffer I
Lysostaphin (2 mg/ml) / Lysozym (25 mg/ml)
Proteinase K Puffer
Proteinase K (25 mg/ml)
Waschpuffer
Sma I Puffer
Restriktionsenzym *Sma* I (5 U/µl)
Lambda Ladder Standard
Saccharomyces cerevisiae Standard
Kontroll-Block-*Staphylococcus*
Kontroll-Kultur-*Staphylococcus*
Block-Gießform

Die im Kit-Nr. 3 enthaltenen Reagenzien unterscheiden sich nur in wenigen Einzelkomponenten vom Kit Nr. 1. Reagenzien aus Kit Nr.3:

Zellsuspensionspuffer
CleanCut Agarose (2 %)
LB (Luria Bertani) Medium
Lysepuffer I
Lysozym (25 mg/ml)
Proteinase K Puffer
Proteinase K (25 mg/ml)
Waschpuffer
Spe I Puffer
Restriktionsenzym *Spe* I (3 U/µl)
Lambda Ladder Standard
Saccharomyces cerevisiae Standard
Kontroll-Block-*Pseudomonas*
Kontroll-Kultur-*Pseudomonas*
Block-Gießform

Inkubationszeiten

Die Inkubationszeiten der drei Hauptarbeitsschritte lassen sich wie folgt darstellen:

Zellwandlyse mittels lytischer Enzyme:
1 Stunde bei 37° C

Zersetzung des zellulären Proteins mit der Proteinase K:
16–20 Stunden bei 50° C

DNA-Restriktion mit einem Restriktionsenzym:
16–20 Stunden bei 37° C oder 20° C, in Abhängigkeit vom Enzym.

Prinzip der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese

Bei der konventionellen Gel-Elektrophorese wandern die negativ-geladenen DNA-Moleküle in einer Richtung zur Anode. Unter diesen Bedingungen wandern DNA-Moleküle < 40–50 Kilobasen größenabhängig durch das Agarosegel. Bei DNA-Molekülen > 40–50 Kilobasen kommt das Phänomen der sog. „reptation“ hinzu, worunter eine longitudinale Ausrichtung dieser großen Moleküle verstanden wird, da die Porengröße im Agarosegel für eine rein horizontale Wanderung hin zur Anode zu klein ist. Bei der PFGE wird ein multidirektionelles elektrisches Feld mit wechselnden Polen und elektrischen Pulsen unterschiedlicher Dauer eingesetzt. Daher müssen die DNA-Moleküle ihre Ausrichtung und Konformation ständig ändern, um sich in Feldrichtung zu orientieren. Dabei benötigen große Moleküle mehr Zeit für die durch das Wechselfeld induzierte Konformationsänderung als kleinere Moleküle. Demnach verbleibt für größere Moleküle weniger Zeit für die Wanderung in Feldrichtung als für kleinere Moleküle. Daraus folgt die bei der PFGE zu beobachtende Auftrennung nach dem Molekulargewicht, wobei auch DNA-Fragmente > 1000 Kilobasen mit Hilfe dieses Verfahrens aufgesplittet werden können. Die Wanderung der Moleküle, je nach ihrer Größe, ist bei der PFGE noch von verschiedenen anderen Faktoren abhängig:

1. Stärke des elektrischen Feldes
2. Pulszeit
3. Konfiguration und Winkel des elektrischen Feldes
4. Temperatur und Ionenkonzentration des Gels und des verwendeten Puffers
5. Art der eingesetzten Agarose (Konzentration, Spezifikation).

Pulszeit und Stärke des elektrischen Feldes sind dabei die entscheidenden Parameter, die den Molekulargewichtsbereich der auftrennbaren DNA-Fragmente festlegen. Somit ist es verständlich, daß bei einer Zunahme der beiden Parameter auch größere Moleküle aufgetrennt werden können. Alle unter 1–5 genannten Faktoren sind beim GenePath Strain Typing System® und den dazugehörigen Kits 1–4 vom Hersteller standardisiert vorgegeben.

Die PFGE kann nun mittels verschiedener technischer Modifikationen durchgeführt werden:

- Contour Clamped Homogenous Electric Field Electrophoresis
- Transverse Alternating Field Electrophoresis
- Crossed Field Gel Electrophoresis und
- Rotating Gel Electrophoresis

Ohne auf die technischen Unterschiede im einzelnen einzugehen, ist darauf hinzuweisen, daß das GenePath Strain Typing System® mit der Countour Clamped Homogenous Electric Field Technik arbeitet. 24 Elektroden sind horizontal auf einem hexagonalen Rahmen in der Elektrophoresekammer angeordnet. Die separate Ansteuerung der Elektroden ermöglicht graduell abfallende Potentiale, durch die ein homogenes elektrisches Feld in der Kammer aufgebaut wird. Bei jedem Wechsel des elektrischen Feldes reorientieren sich die Moleküle.

Bestandteile des GenePath Strain Typing Systems

Zu dem System gehören eine Elektrophoresekammer, eine Einheit zur Steuerung der Elektroden mit integriertem Spannungs- und Pulsgeber, eine Umlaufpumpe für den Elektrophoresepuffer, ein Kühlelement sowie ein Proben- und Gelgießstand. Zur Dokumentation dient ein UV-Transluminator sowie eine Polaroid-Kamera mit Schutzschild.

Intra- und Inter-Assay-Präzision

Zur Überprüfung der Intra- und Inter-Assay-Präzision sowie zur Klärung der Frage, ob ein systematisch unterschiedliches Wanderungsverhalten auf verschiedenen Gel-Spuren vorliegt, wurden u. a. Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA) eingesetzt. Bei der Qualitätskontrolle zur Intra-Assay-Präzision wurden von einem ORSA-Stamm dreimalig je 11 Proben hergestellt und in drei Agarose-Gelen aufgebracht. In den verbleibenden 4 Spuren pro Gel wurden die Kultur- und die Restriktionskontrolle eingesetzt. Mit diesem Ansatz sollten das Restriktionsverhalten der Proben vom gleichen ORSA-Stamm, das Elektrophoreseverhalten der DNA-Fragmente in einem Gel sowie die Vergleichbarkeit des Bandenmusters (DNA-Fingerprinting) von 11 Proben aus einem Stamm untersucht werden (Abb. 1).

Die Testung der Inter-Assay-Präzision erfolgte durch das Mitführen von 3 unterschiedlichen ORSA-Isolaten in 5 verschiedenen Gelen.

Die diversen MRSA-Isolate wurden dabei auf immer wieder wechselnden Gel-Spuren eingesetzt, um ein systematisch unterschiedliches Wanderungsverhalten auf verschiedenen Gel-Spuren auszuschließen. Dies erfolgte durch den anschließenden Vergleich der Bandenmuster des gleichen Stammes, dessen DNA-Fragmente auf wechselnden Spuren aufgetrennt worden waren (Abb 2).

Darüberhinaus wurde eine PFGE mit 5 bekannten *S. aureus* ATCC-Referenzstämmen (Methicillin-sensibel und -resistent) durchgeführt. Ihre Bandenmuster wurden mit dem DNA-Fingerprint unserer Isolate verglichen, und sie dienten als externe Kontrolle in neuen Gelen.

Diskriminationsfähigkeit des neuen Systems bei Verdacht auf nosokomiale Infektionen

Die Einsatzmöglichkeiten des neuen GenePath Strain Typing Systems® wurden anhand von Bakterien-Stämmen getestet, die im Verlauf von nosokomialen Infektionen isoliert worden waren.

In Gel Nr. 2 wurden die DNA-Fragmente von 11 ORSA-Stämmen aufgetrennt, die von 11 verschiedenen Patienten einer chirurgischen Intensivstation aus unterschiedlichen Materialien (Nasen- und Rachenabstrichen, Blutkulturen, Bronchialsekret) isoliert werden konnten. Aufgrund der Häufung der Isolate innerhalb weniger Monate und des ähnlichen Antibiotika-Resistenzverhaltens der MRSA-Stämme bestand der Verdacht auf eine nosokomiale Infektion (Abb. 3).

In Gel Nr. 3 sind im Vergleich dazu 11 ORSA-Isolate von verschiedenen Stationen innerhalb der Uniklinik Düsseldorf und einiger peripherer Krankenhäuser aufgetrennt, um einen Vergleich mit den Isolaten der o. g. chirurgischen Intensivstation zu ermöglichen.

In Gel Nr. 4 und Gel Nr. 6 sind *Enterobacter cloacae*- und *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*-Isolate von einer kinderchirurgischen Intensivstation im Fingerprinting zu sehen. Die *Klebsiella*-Stämme wurden bei 10 verschiedenen Kindern in Rachen- bzw. Ohr-Abstrichen oder in Blutkulturen innerhalb von einem Monat gefunden und zeigten ein identisches Resistenzverhalten. Bei den *Enterobacter*-Stämmen wurden 7 Isolate von verschiedenen Kindern der gleichen kinderchirurgischen Intensivstation gewonnen. Diese *Enterobacter*-Isolierung erfolgte z. T. parallel zum Auffinden der *Klebsiella*-Stämme mit identischem Resistenzverhalten. Im Vergleich dazu sind *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Isolate von Patienten einer chirurgischen Intensivstation aufgeführt (Gel Nr. 5 und Gel Nr. 7).

In den Gelen Nr. 6 und 7 ist auch die Auftrennung von *Enterobacter*-ATCC-Referenzstämmen zu sehen.

Ergebnisse

In Gel Nr. 1 (Abb. 1) ist die Überprüfung der *Intra-Assay-Varianz* dargestellt. Die aus dem gleichen MRSA-Isolat stammenden 11 Proben zeigen alle ein identisches Bandenmuster mit fast identischen Laufstrecken für die einzelnen Restriktionsfragmente. Ein übereinstimmendes Ergebnis zeigten auch die beiden anderen Agarose-Gel-Ansätze zur Kontrolle der *Intra-Assay-Varianz*. Die DNA-Fragmente wurden in diesen Ansätzen annähernd

kollinear und mit vergleichbarer Mobilität aufgetrennt. Damit kann das Restriktionsverhalten der Proben sowie das Elektrophoreseverhalten der einzelnen DNA-Fragmente als hinreichend vergleichbar bezeichnet werden.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse zur *Inter-Assay-Varianz* dargestellt. Je drei unterschiedliche MRSA-Isolate wur-

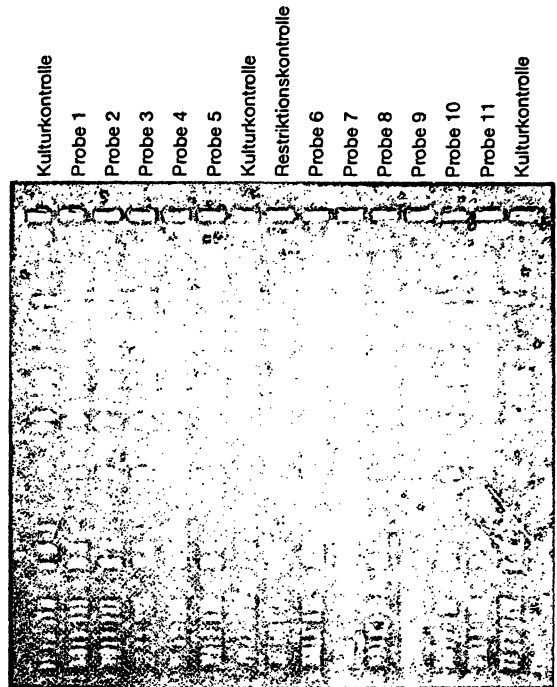
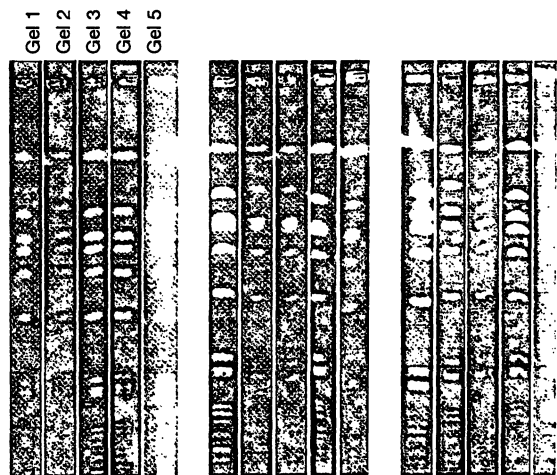


Abb. 1. Gel Nr. 1: Intra-Assay-Varianz



MRSA I MRSA II MRSA III
Abb. 2. Inter-Assay-Varianz

den in 5 verschiedenen Gelen mitgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Läufe wurden eingescannt und nebeneinandergestellt, um das Bandenmuster und die Laufstrecken miteinander vergleichen zu können. Es zeigt sich, daß bei gleichem Bandenmuster auch die Laufstrecken der einzelnen Fragmente fast identisch sind, so daß die Präzision zwischen verschiedenen Gel-Ansätzen als hinreichend genau bewertet werden kann, um fundierte epidemiologische Untersuchungen durchzuführen.

Der Einsatz von gleichen Proben auf verschiedenen Spuren in unterschiedlichen Gelen zeigte eindeutig, daß es kein systematisch unterschiedliches Wanderungsverhalten auf verschiedenen Gel-Spuren beim GenePath Strain Typing System® gibt. Dies wäre zumindest theoretisch denkbar gewesen, unter der Voraussetzung, daß die elektrophysikalischen Bedingungen im gepulsten Feld nicht überall gleich sind.

Abb. 3 (Gel Nr. 2) zeigt sehr anschaulich die klonale Identität von MRSA-Stämmen, welche im Rahmen einer nosokomialen Infektion auf einer chirurgischen Intensivstation aus unterschiedlichen Materialien von 11 verschiedenen Patienten isoliert werden konnten. Der Verdacht auf eine nosokomiale Infektion war durch die Häufung des Auftretens der MRSA-Stämme innerhalb weniger Monaten und ein ähnliches Resistenzverhalten entstanden.

Im Gegensatz dazu sind in Abb. 4 (Gel Nr. 3) eindeutig unterschiedliche MRSA-Isolate von verschiedenen Stationen aus dem Untersuchungsbereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie zu sehen. Dies bedeutet, daß es im Großraum Düsseldorf genotypisch unterschiedliche MRSA-Isolate gibt, die als potentieller Ausgangspunkt einer nosokomialen Infektion in Frage kommen. Im Rahmen einer epidemiologischen Studie konnten in einem Kollektiv von 200 MRSA-Isolaten aus Düsseldorfer Krankenhäusern verschiedene Stämme mit optisch voneinander abweichendem Bandenmuster gefunden werden. Die Ausbreitung dieser Stämme differierte in den einzelnen Krankenhäusern sehr, zum Teil konnten die Infektionswege sogar zurückverfolgt werden. Eine weitere Charakterisierung der unterschiedlichen Isolate mittels Lysotypie, Toxinproduktion, Antibiotikaresistenzverhalten, etc. wurde zusätzlich durchgeführt (Publikation in Vorbereitung). Abb. 5 zeigt die DNA-Fingerprints von bekannten *S. aureus* ATCC-Referenzstämmen. Mit diesen Referenzstämmen können die Bandenmuster der Düsseldorfer Isolate verglichen werden. Damit kann zum einen die genetische Verwandtschaft abgeschätzt werden, und zum anderen dienen diese Stämme in zukünftigen Untersuchungen als externe Kontrollstämmen im Gelansatz.

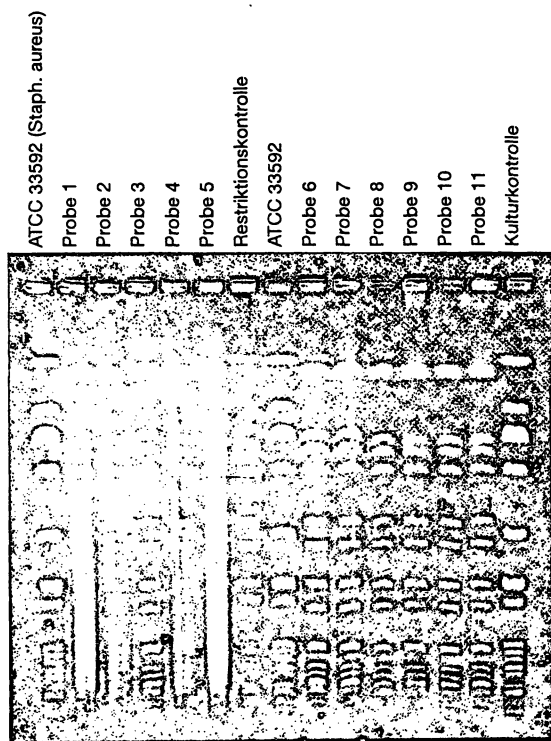


Abb. 3. Gel Nr. 2: 11 ORSA-Stämme einer chirurgischen Intensivstation mit klonaler Identität

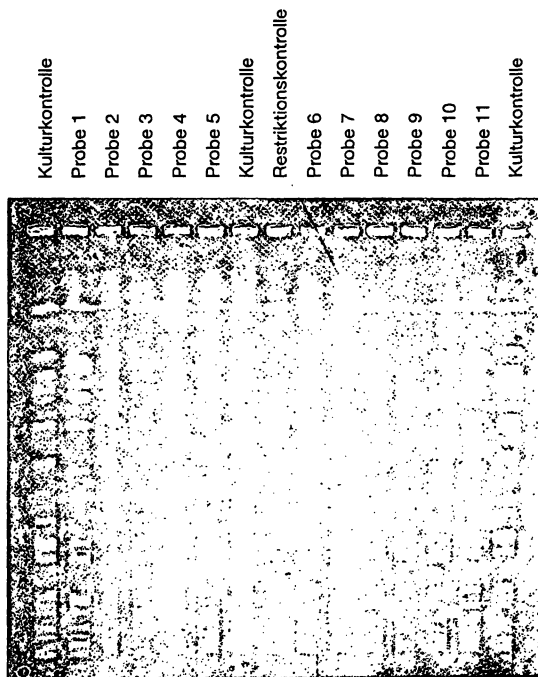


Abb. 4. Gel Nr. 3: Unterschiedliche ORSA-Stämme von verschiedenen Stationen

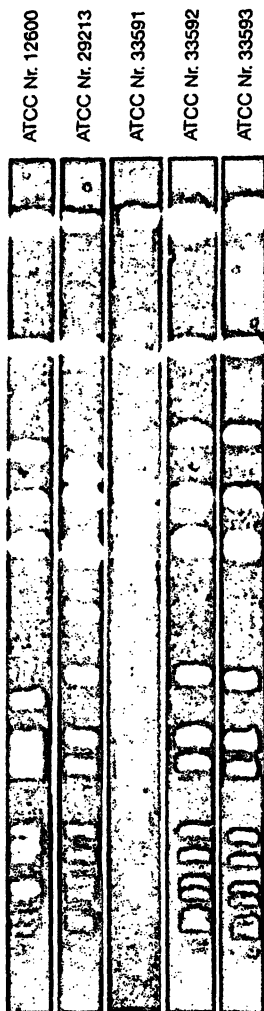


Abb. 5. 5 verschiedene ATCC-Stämme von *S. aureus*

In Abb. 6 (Gel Nr. 4) und Abb. 7 (Gel Nr. 6) sind identische *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*- und *Enterobacter cloacae*-Isolate aus dem Bereich einer kinderchirurgischen Intensivstation aufgeführt.

Die 10 *Klebsiella*-Stämme konnten innerhalb eines Monats aus Ohr- und Rachenabstrichen bzw. aus Blutkulturen von 10 verschiedenen Kindern isoliert werden. Die Keime hatten ein identisches Resistenzverhalten, so daß der Verdacht auf eine nosokomiale Infektion nahe lag. Da es im Rahmen dieser nosokomialen Infektion zu Todesfällen kam, mußte die beteiligte kinderchirurgische Intensivstation zeitweise geschlossen werden, um krankenhaushygienische Maßnahmen durchführen zu können. Parallel zur Isolierung der *Klebsiella*-Stämme konnten auf dieser Station auch gehäuft *Enterobacter cloacae*-Isolate bei verschiedenen Patienten gefunden werden. Bei der Testung von 9 Isolatzen zeigte sich, daß 4 verschiedene Stämme aufgetrennt werden konnten. Dabei ist zu be-

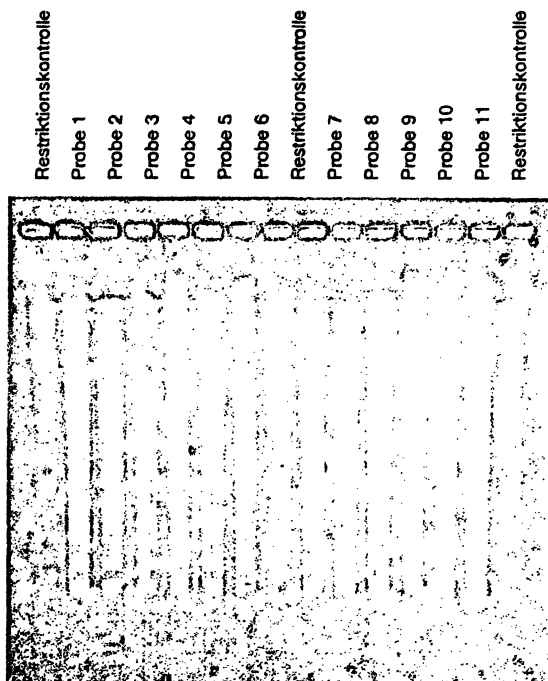


Abb. 6. Gel Nr. 4: 9 identische *Klebsiella*-Isolate einer kinderchirurgischen Intensivstation

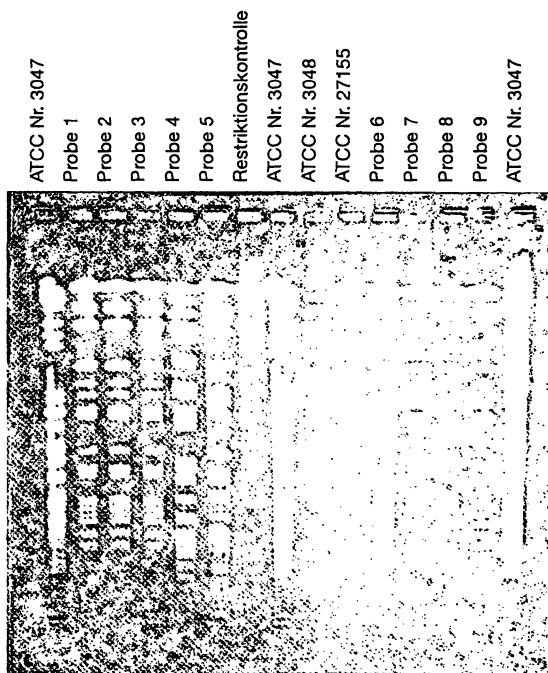


Abb. 7. Gel Nr. 6: *Enterobacter*-Stämme einer kinderchirurgischen Intensivstation

rücksichtigen, daß die Spuren 2–4 und 11–14 identische Bandenmuster zeigen, so daß bei der Ausbreitung dieser beiden Stämme von einer nosokomialen Infektion ausgegangen werden muß.

Um zu testen, ob auch auf einer anderen Intensivstation, bei der sehr häufig Klebsiella- und Enterobacter-Stämme aus Proben isoliert wurden, nosokomiale Infektionen ein Problem darstellten, wurden eingehende Isolate gesammelt und mittels PFGE analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 (Gel Nr. 5) und Abb. 9 (Gel Nr. 7) dargestellt. Es ist zu erkennen, daß 7 bzw. 5 der Stämme eine klonale Identität zeigen, so daß z. T. von einer nosokomialen Infektion auszugehen ist.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, daß mit dem neuen GenePath Strain Typing System® Untersuchungen bezüglich der klonalen Identität von Bakterien-Isolaten mit hinreichender Genauigkeit durchgeführt werden können, um den Verdacht auf nosokomiale Infektionen zu erhärten respektive zu entkräften.

Auf einigen Gelen, insbesondere bei den Enterobacter-Auftrennungen, sind verschmierte Banden und Streifen über der Gel-Spur zu erkennen. Dies kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein:

- Degenerierte Proben: Neue Proben müssen frisch präpariert werden
- DNA-Konzentration ist zu hoch: Ein Neuanfang mit geringerer optischer Dichte bzw. mit kleineren Proben-Blöckchen ist erforderlich

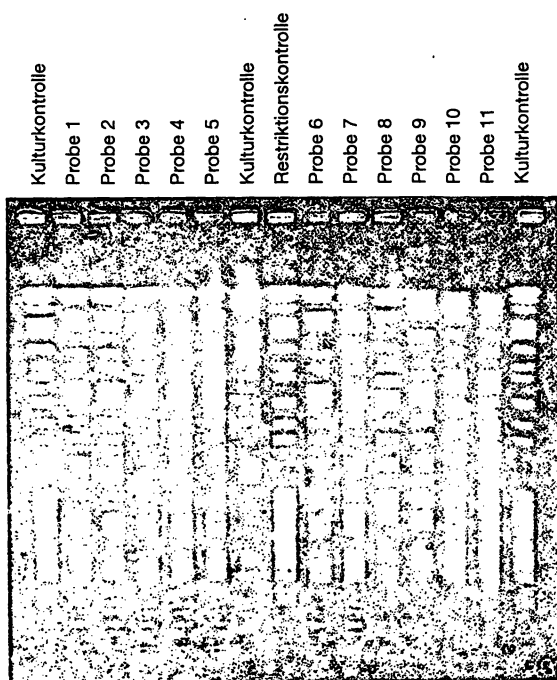


Abb. 8. Gel Nr. 5: Klebsiella-Isolate einer Intensivstation

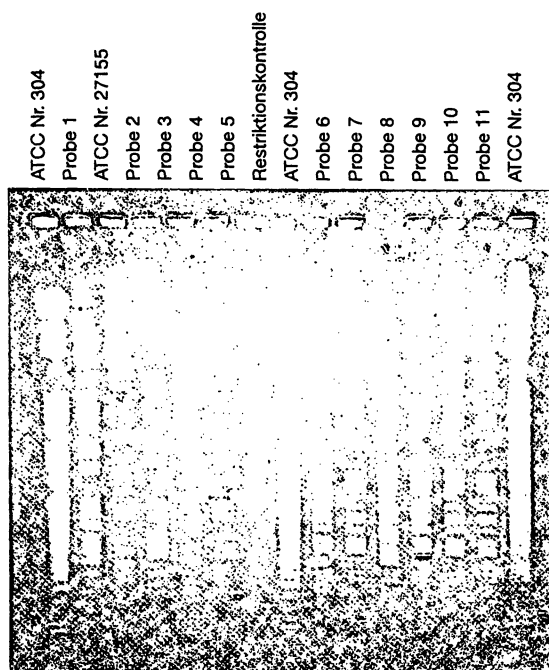


Abb. 9. Gel Nr. 7: Enterobacter-Isolate einer Intensivstation

- Proben wurden nicht ausreichend gewaschen, das Ergebnis ist eine schlechte Restriktionsaufspaltung: Neuanfang mit ausreichendem Waschen der Proben
- Degenerierte Restriktionsenzyme: Neuanfang mit frischen Restriktionsenzymen
- Vertiefungen im Gel sind verzerrt oder beschädigt: Herstellung eines neuen Gels
- Proben-Blöcke wurden beim Einbringen in die Vertiefungen beschädigt: Neuanfang

Die jeweiligen Ursachen für diese technischen Schwierigkeiten sind z. T. schwer zu eruieren. Eine Beseitigung des Problems ist in der Regel durch Versuchs- bzw. Probeläufe für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Keime (*S. aureus*, *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae*) aber relativ schnell möglich gewesen.

Diskussion

Für Untersuchungen zur Verifizierung nosokomialer Infektionen bzw. zur Feststellung der therapeutischen Effizienz einer Antibiotika-Therapie stehen verschiedene phänotypische und genotypische Verfahren zur Verfügung. Aus verschiedenen Methodenvergleichen bei unterschiedlichen Bakterien [3, 4, 5, 6, 7] wird der Stellenwert der PFGE deutlich. Häufig wird an Typisierungsverfahren kritisiert, daß sie

- a) widersprüchliche Ergebnisse liefern,
- b) nur schlecht reproduzierbar sind
- c) nur spezifisch für bestimmte Organismen sind und
- d) damit nicht für alle Organismen eingesetzt werden können sowie
- e) einen zu hohen Aufwand an Zeit, Arbeitskraft und Geld erfordern.

Die PFGE mit dem GenePath Strain Typing System® liefert

- a) optisch leicht zu vergleichende DNA-Bandenmuster, die
- b) reproduziert werden können und
- c) nicht Organismen-spezifisch sind, da die Methode
- d) theoretisch auf alle Organismen angewandt werden kann, bei denen eine chromosomale DNA-Isolierung mit anschließender Restriktion möglich ist, und desweiteren ist zu bedenken, daß
- e) die Analyse mit überschaubarem Arbeitsaufwand innerhalb von drei Tagen vorliegt.

Die gezeigten Abbildungen verdeutlichen anschaulich, wie ein Anhalt für die „klonale Identität“ bei verschiedenen Isolaten von Patienten einer Station erbracht werden kann, so daß eine nosokomiale Infektion vermutet werden muß. Dabei muß bedacht werden, daß der Begriff der klonalen Identität allerdings einer sorgfältigen Überprüfung und Definition bedarf.

Die Interpretation der Ergebnisse ist besonders schwierig, wenn sich die untersuchten Isolate nur in ein bis zwei Eigenschaften voneinander unterscheiden (z. B. die Verschiebung einer Bande auf dem Elektrophorese-Gel). Gehören diese Isolate schon zu unterschiedlichen Stämmen? Durch suffizientere Methoden können immer kleinere genetische Unterschiede detektiert werden, die auch innerhalb des gleichen Stammes während des Verlaufs einer Infektion im Organismus des Patienten, dem kulturellen Wachstumsprozeß oder des Ausbruchs einer nosokomialen Infektion auftreten können. Aufgrund dieser Tatsachen muß der Begriff der klonalen Identität hinterfragt werden. Klonale Identität kann mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht hundertprozentig bewiesen werden, sondern der kritische Untersucher erhält durch die Anwendung gut diskriminierender Methoden nur eine hinreichende Gewißheit, daß die untersuchten Isolate sehr eng miteinander verwandt sind. Berücksichtigt man die normale genetische Drift in Bakterienstämmen, so ist das Konzept der Klonalität mehr in einem relativen als in einem absoluten Sinne zu verstehen. Die Bestimmung der klonalen Identität bedingt daher Kenntnisse über die genetische Stabilität der Organismen, den bestehenden Selektionsdruck aus der Umgebung und die Diskriminationsfähigkeit des eingesetzten Typisierungsverfahrens.

Mit der PFGE ist der Nachweis einer nosokomialen Infektion und das Aufdecken der Infektionswege möglich, die Quelle muß danach von der Klinikhygiene durch geeignete Maßnahmen beseitigt werden.

Möglichkeiten des Einsatzes des neuen GenePath Strain Typing Systems®

Aus den Daten [8] des Centers for Disease Control (CDC) in den USA über die Eintrittspforten bei nosokomialen Infektionen und die beteiligten Keime geht hervor, daß der Urogenitaltrakt bei 42 % der nosokomialen Infektionen die Eintrittspforte darstellt, gefolgt von offenen Wunden (24 %), dem Respirationstrakt (11 %), dem Blutsystem (5 %) und anderen Eintrittspforten (18 %). Die häufigsten Keime bei nosokomialen Infektionen in den USA sind in absteigender Häufigkeitsreihenfolge *E. coli* (16 %), Enterokokken (12 %), *Pseudomonas aeruginosa* (11 %), *S. aureus* einschließlich MRSA, (10 %), andere Staphylokokken, einschließlich der Koagulase-negative Staphylokokken (9 %), *Enterobacter* (7 %) und *Candida* (7 %) sowie andere Keime (28 %).

Die Firma BioRad Laboratories bietet für das GenePath Strain Typing System® 4 verschiedene Kits an, wobei Kit 1 die Reagenzien für gram-positive Bakterien (insbesondere Staphylokokken und Enterokokken) enthält. Kit 2 und 3 beinhalten Reagenzien für gram-negative Bakterien (Kit 2 speziell für *E. coli*, Kit 3 für *Pseudomonas* und *Enterobacter*), während Kit 4 speziell auf *Candida* zugeschnitten ist. Mit diesen Reagenziensätzen soll die DNA von Erregern, die für 72 % der nosokomialen Infektionen verantwortlich sind, mittels PFGE aufgetrennt werden können. Weitere Keime, die bei 13 % der in den USA beobachteten nosokomialen Infektionen isoliert werden (Streptokokken, *Acinetobacter*, *Salmonellen*, *Legionella pneumophila* und *Neisseria meningitidis*), sollen durch Modifikationen der eingesetzten Zellzahl im Testansatz bzw. durch die Verwendung anderer Restriktionsenzyme mit Hilfe des GenePath Strain Typing Systems® typisiert werden können. Damit ist theoretisch zur Zeit bei 85 % der Erreger, die im Verlauf nosokomialer Infektionen isoliert werden können, ein DNA-Fingerprint mit diesem System möglich. Die Herstellerfirma betont, daß es zur Zeit intensive Bestrebungen gebe, um auch die restlichen Bakterienspezies durch Modifikation in den Reagenziensätzen und in den Programm-Konfigurationen (geänderte Pulszeit und Feldstärke) mittels PFGE aufzutrennen zu können. Theoretisch müßte dies mit jedem Organismus gelingen, bei dem eine Restriktion der DNA mit anschließender elektrophoretischer Trennung möglich ist. Auch Viren und Parasiten sollen in Zukunft mit dem Gerätesystem typisierbar sein, wobei bei Viren aufgrund ihrer geringen Genomgröße evtl. die Technik der Field Inversion Gel Electrophoresis Verwendung finden wird. In das GenePath Strain Typing System® wurde diese technische Modifikation integriert und zusätzliche Programm-Konfigurationen sind, laut Hersteller, leicht im Gerät abzuspeichern.

Praktische Aspekte beim Einsatz des GenePath Strain Typing Systems®

Der Vorteil des GenePath Strain-Typing Systems® liegt in der Standardisierung der Reagenziensätze sowie der Probenverarbeitung und der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente unter optimierten, konstanten Bedingungen. Damit sollte eine hohe Reproduzierbarkeit verbunden sein, so daß auch Ergebnisse von Labor zu Labor zweifelsfrei miteinander verglichen werden können.

Obwohl die Benutzung der Reagenzien, die Handhabung des Systems sowie die Dokumentation der Bandenmuster relativ einfach ist und schnell erlernt werden kann, gibt es auch einige Kritikpunkte am System bzw. einzelnen Bestandteilen, die im Folgenden aufgeführt werden:

- Bei der Gelform gibt es gelegentlich Probleme durch eine variierende Dicke des Gels.
- Am Gelkamm gibt es überflüssige Justierungsmöglichkeiten, so daß eine lästige Neueinstellung der Slottiefe nach jeder Reinigung der Form nötig ist.
- Das Aufkochen des Gels erfolgt ohne Zeitvorgabe durch den Hersteller, so daß die Standardkonzentration theoretisch unterschiedlich sein kann.
- Das Handling der kleinen, durchsichtigen Agaroseblöckchen ist z. T. recht diffizil.
- Die Behälter für die Cleancut/Lowmelt-Agarose sind zu klein, so daß leicht ein Überkochen beim Erhitzen auftritt.
- Die Programme bezüglich Pulszeit und Feldstärke sind fest eingespeichert; dies ist zwar sehr benutzerfreundlich, doch ist keine Programminformation mit Detailangaben zugänglich.
- Der Screen-Modus, mit dem innerhalb von 4 Stunden die ersten Informationen zum Bandenmuster geliefert werden sollen, ist nur bedingt brauchbar, da die Diskriminationsfähigkeit der Banden nach einer so kurzen PFGE-Zeit relativ schlecht ist und somit kaum ein Bandenmustervergleich durchgeführt werden kann.
- Das im Gerätepaket enthaltene Kühlelement zeigte Qualitätsprobleme, so daß die vorgegebene Temperatur für den Puffer (14° C) nur eine gewisse Zeit (mehrere Wochen) gehalten werden konnte, und ein Austausch notwendig wurde. Im PFGE-Labor steht zur Zeit das dritte Kühlelement, doch muß berücksichtigt werden, daß das GenePath Strain Typing System® einem 24-stündigen Dauerbetrieb seit 4 Monaten ausgesetzt war. Durch das unzuverlässige Kühlelement entstanden Temperaturschwankungen im Puffer, so daß es zu variierenden Laufstrecken von DNA-Fragmenten im Gel kam.
- Auch bei der Elektrophoresekammer traten Qualitätsprobleme auf. Aufgrund schlechter Materialverarbeitung war die Kammer zweimal undicht und mußte ausgetauscht werden. Bei der aktuell benutzten Kammer sind allerdings keine derartigen Probleme zu beobachten.
- Die Schlauchführung zwischen Kühlelement und Elektrophoresekammer ist unpraktisch und es besteht

die Gefahr des Hängenbleibens am Schlauch beim Hantieren an der Elektrophoresekammer.

- Die in den Test-Kits eingesetzten Größenstandards (z. B. Lambda Ladder- und *Saccharomyces cerevisiae*-Standard) trennen sich gelegentlich nicht oder anders als beschrieben auf, sodaß andere Größenstandards verwendet werden müssen.

Insgesamt sollte gesagt werden, daß die manuelle Geschicklichkeit des Untersuchers, trotz weitgehender Standardisierung der Versuchsbedingungen, einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Qualität der Trennmuster hat. Die Qualitätsprobleme bei einzelnen Bestandteilen des Systems sollten sicherlich in Zukunft nicht mehr auftreten. Dabei ist natürlich auch zu berücksichtigen, daß im Rahmen dieser Evaluation das erste GenePath Strain Typing System®, welches in Europa zur Verfügung stand, getestet wurde und somit technische Anlaufschwierigkeiten normal sind.

Interpretation der dokumentierten DNA-Bandenmuster

Mit der hier vorgestellten Makrorestriktionsanalyse können Bakterienstämme aufgrund des DNA-Bandenmusters typisiert werden. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind selektionsneutrale Marker, die im Verlauf der Evolution des Bakterienchromosoms über Rearrangements oder Mutation an einer Stelle des Genoms verlorengelassen und an anderer Stelle neu entstehen können. Nicht miteinander verwandte Klone einer Spezies zeigen demnach unterschiedliche Bandenmuster, während die Varianten eines Klonen sehr ähnliche Bandenmuster besitzen. Bei klonaler Identität sollten die Bandenmuster identisch sein. Dies ist schematisch in Abb. 10 dargestellt. Die Isolate A und B besitzen ein identisches Bandenmuster, so daß von Isolaten des gleichen Stammes ausgegangen werden muß. Die Isolate E und F zeigen deutlich unterschiedliche Bandenmuster und sind eindeutig verschieden von A und B, so daß es sich um zwei andere Stämme handelt. Die Isolate C und D unterscheiden sich von A und B durch jeweils eine Bande (Nr. 4 bzw. 8, siehe Abb. 10). Die Stämme sind damit unterschiedlich zum Stamm mit den Isolat A und B, doch ist der „verwandtschaftliche Grad“ näher als zu den 2 Stämmen mit den Isolat E und F. Die 2 Stämme mit den Isolat C und D sind damit genetisch ähnlich zum Stamm mit den Isolat A und B. Die Isolate C und D könnten z. B. durch Insertion und/oder Deletion von genetischem Material aus A und B hervorgegangen sein.

Bei einem Vergleich von nur wenigen Isolat, die auf einem einzigen Gel analysiert wurden, reicht der visuelle Vergleich der einzelnen Bandenmuster in der Regel aus, um die Frage nach klonaler Identität beantworten zu können. Schwieriger wird es, wenn Bandenmuster von verschiedenen Gelen miteinander verglichen werden sollen.

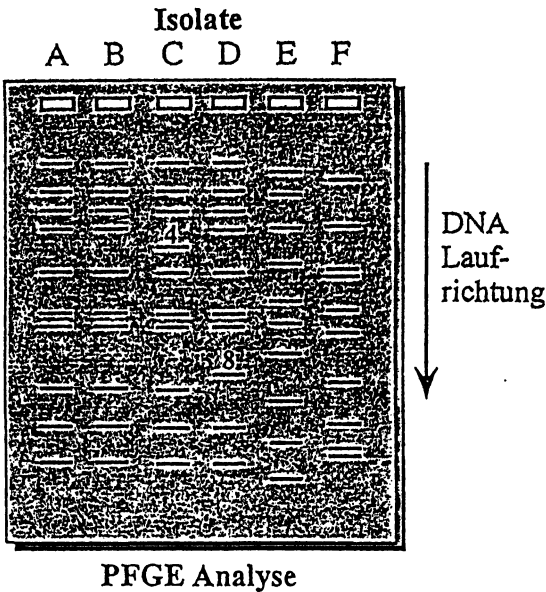


Abb. 10. Grobschematisches Restriktionsfragment-Bandenmuster nach PFGE-Analyse (Interpretation und Auswertung siehe Text)

In diesen Fällen sollten neben Kultur- und Restriktionskontrollen auch 1–2 Referenzstämme (z. B. ATCC-Referenzstämme) im Gel aufgetrennt werden, um das Laufverhalten der Stämme in verschiedenen Gelen quantitativ beurteilen zu können. Durch die Verwendung von Referenzstämmen können auch evt. auftretende Inhomogenitäten im elektrischen Feld erfaßt werden, doch konnte in unseren Experimenten kein Anhalt für solche Inhomogenitäten beim GenePath Strain Typing System® gefunden werden. Der sicherste Weg zur Verifizierung einer klonalen Identität von zwei Isolaten, deren DNA in unterschiedlichen Gelen aufgetrennt wurde, ist dabei natürlich die Makrorestriktionsanalyse beider Stämme in einem neuen PFGE-Lauf auf benachbarten Spuren.

Für die epidemiologische Analyse von Epidemien bzw. Epidemien ist die Typisierung einer großen Anzahl von Stämmen notwendig. In solchen Fällen reicht der visuelle Vergleich nicht aus. Stattdessen muß eine quantitative Auswertung der Fragmentlängenmuster vorgenommen werden. Dazu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (z. B. die Berechnung des Dice-Koeffizienten), auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

Auf dem Software-Markt gibt es inzwischen mehrere Firmen, die sich u. a. auf das Gebiet der Geldokumentation und -auswertung spezialisiert haben und fertige Programme zur Analyse der genetischen Distanz verschiedener Stämme anbieten.

Bezüglich des Einsatzes von Systemen oder Methoden zur Überprüfung eines Verdachtes auf nosokomiale Infektionen oder für epidemiologische Fragestellungen

ist allerdings zu betonen, daß zur Zeit unter anderem auch die Puls-Feld-Gel-Elektrophorese nur von solchen Einrichtungen durchgeführt werden sollte, die genau mit der Methodik und deren Fehlerquellen vertraut sind.

Zusammenfassend steht mit dem neuen GenePath Strain Typing System® eine interessante Gerätekonfiguration für die PFGE zur Verfügung. Durch konfektionierte Reagenziensätze und fest eingespeicherte PFGE-Programme liegen optimierte und vergleichbare Versuchsbedingungen vor, die eine weitgehend standardisierte PFGE ermöglichen. Trotz der relativ einfachen Handhabbarkeit des Systems und der Reagenzien bleibt allerdings die Qualität der Trennmuster abhängig von der manuellen Geschicklichkeit des Untersuchers. Die klassischen Fragestellungen der Infektionsepidemiologie können mit dem neuen System gut bearbeitet werden. Der Erfolg hygienischer Maßnahmen sowie auch die Effizienz einer Antibiotika-Therapie können mit Hilfe dieses Systems kontrolliert werden. Eine Kopplung an ein EDV-gestütztes System zur direkten Dokumentation und Quantifizierung der gefärbten DNA-Gele ist zur Zeit, wie auch der Aufbau einer Datenbank zum biomathematischen Vergleich verschiedener Bandenmuster, in der Erprobung.

Literatur

- Emori TG, Gaynes RP (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 6, 428–442
- Mauff G (1994) Epidemiologie übertragbarer Erkrankungen. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie* (Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G eds). Gustav Fischer Verlag, Germany, pp 48–62
- Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD (1993) Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 17, 153–164
- Goering RV (1993) Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 14, 595–600
- Römling U, Fislage R, Tümmeler B (1995) Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern. *Immun Infekt* 23, 4–8
- Römling U, Heuer T, Tümmeler B (1994) Bacterial genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis techniques. In: *Advances in electrophoresis* (Chrambach A, Dunn MJ, Radola BJ eds.). VCH Weinheim, Germany, Vol. 7, pp 353–406
- Schlichting C, Branger C, Fournier JM, Witte W, Boutonnier A, Wolz C, Goullet P, Döring G (1993) Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *J Clin Microbiol* 31, 227–232
- Martone WJ, Jarvis WR, Culver DH, Haley RW (1992) Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections. In: *Hospital infections* (Bennett JV, Brachman PS eds). Little, Brown and Co., Boston, USA, 3rd ed, pp 577–596