

کمپیلوباکتر و سندرم آپاندیکولار: گزارش ۶ مورد

دکتر محمد کاظم شریفی یزدی^۱، دکتر محمد مهدی سلطان دلال^{۲*}

۱. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۲. مرکز تحقیقات زئونوز، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۳. بخش میکرب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۴. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

چکیده

سابقه و هدف: آپاندیسیت، یکی از متداولترین ضایعات التهابی دستگاه گوارش است که افراد زیادی به آن مبتلا می‌شوند. عوامل ایجاد کننده آپاندیسیت متعدد می‌باشد. در میان این عوامل، عفونت‌های باکتریایی دستگاه گوارش، سهم عمده‌ای دارند. از مهمترین عوامل باکتریایی ایجاد کننده آپاندیسیت، کمپیلوباکتر می‌باشد. در این مقاله، شش مورد پسودوآپاندیسیت ناشی از گونه‌های کمپیلوباکتر گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: طی یکسال، از ۲۱۶ نمونه‌ی بافتی آپاندیسیت، با استفاده از روش غنی‌سازی در آبگوشت تیوگلیکولات (pH=۸/۵) اقدام به جداسازی کمپیلوباکتر گردید. پس از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها در محیط charcoal blood حاوی آنتی‌بیوتیک‌های cefoperazone و amphotericin B (Biomerieux) کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط میکروآیروفلیک در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. گونه‌های کمپیلوباکتر با شکل مشخص S در رنگ‌آمیزی گرم، متحرک، اکسیداز مثبت و هیدرولیز هیپورات، انتخاب شدند.

یافته‌ها: از ۲۱۶ نمونه آپاندیسیت مورد بررسی، ۵ مورد کمپیلوباکتر ژژونی و ۱ مورد کمپیلوباکتر فتوس جدا گردید. ایزوله‌های کمپیلوباکتر، مقاومت بالایی نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید، از خود نشان دادند. **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده نشان می‌دهد در موارد مشکوک به آپاندیسیت، نیاز به توجه بیشتر به عوامل میکروبی، به ویژه گونه‌های کمپیلوباکتر وجود دارد.

واژگان کلیدی: کمپیلوباکتر، آپاندیسیت، جداسازی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Sharifi Yazdi MK, Soltan Dallal MM. Campylobacter and appendicular syndrome: Report of 6 cases. *Pejouhandeh* 2013;18(4):208-212.

مقدمه

آپاندیسیت یکی از متداولترین ضایعات التهابی دستگاه گوارش می‌باشد که علل مختلفی داشته و افراد زیادی به آن مبتلا می‌شوند. متخصصین جراحی، در طی عمل آپاندکتومی، به درمان این بیماری می‌پردازند (۱). تعداد زیادی از مواردی که به عنوان آپاندیسیت حاد تشخیص داده می‌شوند، در حقیقت ناشی از التهاب حاد مخاط مجرای گوارش در ناحیه‌ی terminal ileum و پلاک‌های پی‌یر، به علت کلونیزه شدن،

نفوذ و حمله‌ی کمپیلوباکتر می‌باشند. این رخداد، علایمی شبیه به آپاندیسیت، شامل درد شکمی در ناحیه‌ی right lower quadrant، تهوع، بی‌حالی و لکوسیتوز ایجاد می‌کند (۲). عمل جراحی آپاندکتومی، با آنکه جزو ساده‌ترین اعمال جراحی محسوب می‌شود، می‌تواند موجب زیان‌های اقتصادی، جانی و بهداشتی گردد که از آن جمله می‌توان به میزان مرگ و میر بعد از بیهوشی، عفونت‌های بیمارستانی متعاقب عمل جراحی، مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، هزینه‌های اقتصادی درمان، اتلاف نیروی تخصصی درمانی و اشغال مکان‌های تخصصی درمانی برای جامعه، اشاره کرد (۳). این در حالی است که انجام این عمل، شاید هیچ ضرورتی نداشته باشد.

*نویسنده مسؤؤل مکاتبات: دکتر محمد مهدی سلطان دلال؛ بخش میکروبی‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت؛ و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱؛ پست الکترونیک: soltanirad34@yahoo.com

روی کاغذ تماس داده می‌شود. سپس ۱۰ ثانیه صبر کرده و در صورت ظهور رنگ بنفش در طی این مدت، باکتری اکسیداز مثبت و در غیر این صورت، اکسیداز منفی می‌باشد.

به منظور شناسایی آنزیم کاتالاز، از تست کاتالاز استفاده شد. به این ترتیب که یک قطره آب مقطر استریل روی لام گذاشته شده و با لوپ استریل، باکتری از محیط کشت خون‌دار برداشته و به خوبی در آب یکنواخت گردید. سپس یک قطره معرف کاتالاز (آب اکسیژنه ۳٪) به آن اضافه شده که در صورت مشاهده حباب روی لام، باکتری کاتالاز مثبت و در صورت عدم مشاهده حباب، باکتری باکتری کاتالاز منفی می‌باشد.

برای شناسایی آنزیم اوره‌آز، از تست اوره‌آز استفاده شد. به این ترتیب که پس از ظاهر شدن کلونی‌های کمپیلوباکتر در سطح محیط انتخابی کمپیلوباکتر بلا‌دآگار، به میزان نصف یک لوپ، باکتری به محیط اوره‌اندل (بیومریو) منتقل شده و در گرمخانه قرار داده می‌شود. اگر حداکثر تا دو ساعت، رنگ محیط از صورتی پوست‌پیزی به ارغوانی تغییر پیدا کند، نشان‌دهنده تجزیه‌ی اوره و تولید آمونیاک و افزایش pH است که منجر به تغییر رنگ اندیکاتور در شرایط قلیایی شده است. لازم به ذکر است که عدم تغییر رنگ طی دو ساعت، نشان‌دهنده عدم تجزیه‌ی اوره و در نتیجه، منفی بودن تست می‌باشد.

یافته‌ها

از ۲۱۶ نمونه‌ی بافتی بیماران، در ۶ مورد، کمپیلوباکتر (۵ مورد کمپیلوباکتر ژژونی و یک مورد کمپیلوباکتر فتوس) جدا گردید (جدول ۱).

مقاومت ارگانسیم‌های جدا شده به اریترومايسين ۱۶/۷٪، سیپروفلوکساسون ۶۶/۷٪، تتراسایکلین ۸۳/۳٪، استرپتومايسين ۱۶/۷٪، جنتامایسین ۰٪، نالیدیکسیک اسید ۸۳/۳٪، آموکسی‌سیلین/اکلوانیک اسید ۰٪، کلرامفنیکل ۰٪ و آمپی‌سیلین ۳۳/۳٪ بود. وضعیت گونه‌های کمپیلوباکتر در ارتباط با علائم بالینی و آزمایشگاهی در جدول ۲ بیان شده است.

بحث:

آپاندیسیت یکی از متداول‌ترین ضایعات التهابی دستگاه گوارش می‌باشد که علل مختلفی داشته و افراد زیادی به آن مبتلا می‌شوند. متخصصین جراحی، در طی عمل آپاندکتومی، به درمان این بیماری می‌پردازند (۱ و ۳).

با بکارگیری تکنیک‌های صحیح کاربردی مانند سونوگرافی و روش‌های آزمایشگاهی همچون الایزا، ایمونوفلورسانس و حتی PCR، امروزه در کشورهای پیشرفته با تشخیص صحیح موارد پسودوآپاندیسیت، که توسط میکروب‌های پاتوژن التهاب‌زا مانند کمپیلوباکتر ایجاد می‌شوند، از انجام عمل جراحی بی‌مورد، جلوگیری می‌شود (۴-۶). در این مقاله شش مورد پسودوآپاندیسیت ناشی از گونه‌های کمپیلوباکتر گزارش می‌شود.

مواد و روشها

طی یکسال، از ۲۱۶ نمونه بافتی آپاندیسیت با استفاده از روش غنی‌سازی در آبگوشت تیوگلیکولات (pH=۸/۵) به شرح زیر، اقدام به جداسازی کمپیلوباکتر گردید:

با هماهنگی پرسنل اطاق عمل و پزشک متخصص جراح، قطعه‌ای از انتهای proximal آپاندیس، به طور استریل و قبل از مرحله فرمل‌گذاری، جدا و پس از قرار دادن در لوله‌های درپیش‌دار محتوی آبگوشت تیوگلیکولات (pH=۸/۵)، در یخچال نگهداری شد (۷). پس از انتقال به دانشکده، در محیط کشت اختصاصی کمپیلوباکتر charcoal blood آنتی‌بیوتیک‌های cefoperazone و amphotericin B (Biomerieux) و در شرایط میکروآیروفیلیک در گرمخانه با دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده و طی ۲-۴ روز بعد، کلونی‌های مشکوک، بررسی و پس از رنگ آمیزی گرم و آزمایشات بیوشیمیایی تشخیصی، شناسایی شدند (۸). پس از تشخیص قطعی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان، به روش دیسک دیفیوژن یا استفاده از دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ارزیابی گردید (۹).

برای رنگ آمیزی گرم، ابتدا به مدت یک دقیقه کریستال ویوله، روی گسترش ریخته و با لوگول شستشو داده شده و سپس گسترش با الکل، تمیز و پس از آن با آب شستشو داده شدند. پس از خشک شدن، به مدت ۰/۵ دقیقه فوشین را روی گسترش اضافه نموده و با آب شستشو داده و پس از خشک شدن، با افزودن روغن ایمرسیون در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر، مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور شناسایی سیستم سایتوکرم اکسیداز در باکتری، از تست اکسیداز استفاده شد. به این ترتیب که روی کاغذ صافی یک قطره از معرف تترامیتیل پارافنیل دی آمین ریخته و به کمک پیپت پاستور، از چند کلونی مشابه کلونی‌هایی که برای تهیه‌ی گسترش استفاده شده بود، برداشت کرده و به خوبی

جدول ۱. میزان فراوانی کمپیلوباکتر در نمونه‌های آپاندیس.

تعداد نمونه (مجموع=۲۱۶)	گونه های کمپیلوباکتر
۵ (۲/۳٪)	کمپیلوباکتر ژژونی
۱ (۰/۵٪)	کمپیلوباکتر فتوس
۶ (۲/۸٪)	کل نمونه‌های کمپیلوباکتر

جدول ۲. وضعیت گونه‌های کمپیلوباکتر در ارتباط با علائم بالینی و آزمایشگاهی.

ردیف	پاتولوژی	نوع کمپیلوباکتر	WBC	علائم بالینی	جنس	سن
۱	Lymphoid, Follicular, Hyperplasia	<i>C. jejuni</i>	۸۸۰۰ نرمال	تب، تهوع و استفراغ، درد شکم، بی‌اشتهایی	مذکر	۲۲
۲	Acute Suppurative, Appendicitis	<i>C. jejuni</i>	۱۴۱۰۰ غیر نرمال	تب، تهوع و استفراغ، درد شکم	مؤنث	۴۵
۳	Lymphoid, Follicular, Hyperplasia	<i>C. fetus</i>	۶۶۰۰ نرمال	تب، تهوع و استفراغ، درد شکم	مؤنث	۱۶
۴	Lymphoid, Follicular, Hyperplasia	<i>C. jejuni</i>	۱۲۵۰۰ غیر نرمال	تب، تهوع و استفراغ، درد شکم، بی‌اشتهایی	مؤنث	۸
۵	Lymphoid, Follicular, Hyperplasia	<i>C. jejuni</i>	۸۶۰۰ نرمال	تب، تهوع و استفراغ، درد شکم	مذکر	۲۲
۶	Acute Suppurative, Appendicitis	<i>C. jejuni</i>	۹۲۰۰ نرمال	تب، تهوع و استفراغ، درد شکم	مذکر	۱۰

ارگانسیم از یک مورد می‌تواند جداسازی شود. میکروب‌هایی که به طور معمول در بیماری شرکت می‌کنند شامل گونه‌های هوازی و بی‌هوازی، با شیوع بیشتر باکترئید فراژلیس و اشریشیا کولی می‌باشند (۱۲، ۱۶ و ۱۷). اگرچه آپاندیسیت وابسته به کمپیلوباکتر قبلاً مورد بحث قرار گرفت، اما تصور می‌شود که مسؤل تعداد کمی از موارد آپاندیسیت باشد (۱۸). Campbell و همکارانش اخیراً گزارش کرده‌اند که کمپیلوباکتر ژژونی می‌تواند تقریباً از یک چهارم نمونه‌های آپاندیسیت حاد، جداسازی شود. این محققان، ۵۰ مورد از آپاندیسیت حاد را از آرشیو خود انتخاب کرده و برای استخراج DNA و آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، ذخیره‌سازی کردند. گروه کنترل شامل ۲۰ نمونه‌ی بافت شناسی با بافت نرمال آپاندیس بود. DNA کمپیلوباکتر ژژونی در ۲۲٪ از نمونه‌های آپاندیسیت یافت شد، در حالی که تمامی نمونه‌های کنترل، فاقد آن بودند. تفاوتی از لحاظ بافت شناسی بین موارد آپاندیسیت با کمپیلوباکتر ژژونی و نمونه‌های بدون آن، وجود نداشت (۶).

برطبق یک گزارش آماری از سازمان دفاع آمریکا، از بین ۴۹۵۰ مورد عمل جراحی آپاندکتومی که در طول یک سال در بیمارستان‌های ارتش انجام گرفت، ۱۲/۸٪ از آپاندیس‌ها، نرمال بودند. به طور کلی در آمریکا، سالیانه در حدود ۲۵۰ هزار عمل جراحی که مشکوک به آپاندیسیت هستند انجام می‌گیرد، که در مورد تقریباً ۲۰٪ آنها (۵۰ هزار مورد)، انجام عمل جراحی ضروری نبوده است. هزینه‌ی هر عمل جراحی در آمریکا در حدود ۴۷۰۰ دلار و مجموع هزینه‌ها در یک سال،

امروزه، با بررسی‌های میکروب شناسی و هیستوپاتولوژی، به وضوح ثابت شده است که تعداد زیادی از مواردی که به عنوان آپاندیسیت حاد تشخیص داده می‌شوند، در حقیقت ناشی از التهاب حاد مخاط مجرای گوارشی در ناحیه‌ی terminal ileum و پلاک‌های پی‌یر، به علت کلونیزه شدن، نفوذ و حمله‌ی کمپیلوباکتر بوده و انجام عمل جراحی شاید هیچ ضرورتی نداشته باشد (۲، ۴ و ۵). لذا با این بررسی می‌توان به این پرسش پاسخ داد که انجام عمل آپاندکتومی در بیماران با علائم مشکوک به آپاندیسیت، تا چه اندازه ضرورت دارد.

طی چند سال اخیر، تحقیقات زیادی در کشورهای اسکندیناوی (سوئد، دانمارک، فنلاند، هلند)، آمریکا و کانادا، در مورد عفونت‌های روده‌ای کمپیلوباکتر، انجام شده است (۱۳-۹). لازم به ذکر است که علائم بالینی انتریت کمپیلوباکتر ایجاد شده توسط *C. coli* و *C. jejuni*، از یکدیگر قابل تشخیص نیستند. لذا، به دلیل عدم وجود تفاوت‌های کافی، بدون انجام تست‌های آزمایشگاهی روی اسهال ایجاد شده توسط سایر باکتری‌های پاتوژن مانند سالمونلا و شیگلا، نمی‌توان به تشخیص قطعی دست یافت (۱۶-۱۴).

در مطالعه‌ی حاضر، از ۲۱۶ نمونه آپاندیس مورد بررسی، میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ۶ مورد (۲/۸٪) گزارش شد که کمپیلوباکتر ژژونی با فراوانی ۵ مورد (۲/۳٪)، بیشترین شیوع را دارا می‌باشد و پس از آن، کمپیلوباکتر فتوس با فراوانی ۱ مورد (۰/۵٪)، در رده‌ی دوم قرار دارد. آپاندیسیت، در اصل یک بیماری چند میکروبی است. به طور شاخص بیش از ۱۰

نتیجه‌گیری:

اگرچه در مورد نقش بیماری‌زایی کمپیلوباکتر ژژوونی در آپاندیسیت اطمینان کاملی وجود ندارد، اما مهم آن است که در این مطالعه برای نخستین بار، وجود کمپیلوباکتر در نمونه‌های آپاندیسیت جراحی شده، مشخص گردید. از سوی دیگر، به دلیل میزان شیوع کم، اهمیت چندانی به تشخیص کمپیلوباکتر در آزمایشگاه‌های میکرب‌شناسی داده نشده و توجه چندانی به آموزش نیروی متخصص و بکارگیری روش‌های نوین میکرب‌شناسی نمی‌شود. به همین دلیل شاید میزان واقعی شیوع کمپیلوباکتر، بیشتر از آمارهای ذکر شده باشد. در این تحقیق، آمار جداسازی ۲/۴٪ کمپیلوباکتر از آپاندیس ارایه گردید که در چند سال اخیر در خاورمیانه چنین گزارشی مشاهده نشده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله، نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۳۸۷۹ مورخ ۱۳۹۰/۲/۳۱ می‌باشد.

بالغ بر ۲۳۵ میلیون دلار برآورد شده است (۱۹). بر همین اساس، مطالعات فراوانی در خصوص راه‌اندازی تکنیک‌های نوین آزمایشگاهی، به منظور تشخیص بهتر آپاندیسیت، در حال انجام است.

اسهال ناشی از کمپیلوباکتر را می‌توان با یک فلوروکینولون یا اریترومايسين و در صورت نیاز، هیدراته کردن بیمار درمان کرد. اریترومايسين اولین آنتی‌بیوتیک انتخابی در درمان التهاب روده‌ای ناشی از کمپیلوباکتر است. موارد مقاوم گزارش شده در کشورهای توسعه یافته، به ندرت از ۵٪ تجاوز می‌کند. البته این آمار ممکن است در کشورهای در حال توسعه، بیشتر باشد (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۶۶/۷٪، ۸۳/۳٪ و ۸۳/۳٪ تعیین شد که این میزان مقاومت بالا، نگران‌کننده می‌باشد.

ارزش درمان ضد میکروبی در انتزیت کمپیلوباکتر، محدود است، زیرا بیشتر بیماران تا مشخص شدن جواب آزمایشگاه، کاملاً بهبود یافته‌اند. از آنجا که بهبودی سریعتر، تنها ارزش درمان ضد میکروبی محسوب می‌شود، بهتر است فقط برای بیماران بدحال و بیماران مبتلا به نقص ایمنی، استفاده شود (۲۱).

REFERENCES

- Andersson N, Griffiths H, Murphy J, Roll J, Serenyi A, Swann I, et al. Is appendicitis familial? Br Med J 1979;2:697-8.
- Rabah R. Pathology of the appendix in children: an institutional experience and review of the literature. Pediatr Radiol 2007; 37(1):15-20.
- Petro M, Minocha A. Asymptomatic early acute appendicitis initiated and diagnosed during colonoscopy: A case report. World J Gastroenterol 2005;11:5398-400.
- Heymann DL, editor. Control of Communicable Diseases Manual. 18th ed. Washington DC: American Public Health Association; 2004. p. 15-20.
- Van Spreeuwel JP, Lindeman J, Bax R, Elbers HJ, Sybrandy R, Meijer CJ. Campylobacter-associated appendicitis: prevalence and clinicopathologic features. Pathol Annu 1987;22(Pt 1):55-65.
- Campbell LK, Havens JM, Scott MA, Lamps LW. Molecular detection of *Campylobacter jejuni* in archival cases of acute appendicitis. Mod Pathol 2006;19(8):1042-6.
- Ladrón de Guevara C, Pérez-Pomata MT, Agulla A, Merino FJ, Villasante PA, Velasco AC. Recovery of Campylobacter from human faeces stored at 4 degrees C. Epidemiol Infect 1989;102(2):281-5.
- Skirrow MB, Benjamin J. Differentiation of enteropathogenic Campylobacter. J Clin Pathol 1980;33:1-122.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement. M100-S15. 14th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA; 2005.
- Studahl A, Andersson Y. Risk factors for indigenous Campylobacter infection: a Swedish case-control study. Epidemiol Infect 2000;125:269-75.
- Neimann J, Engberg J, Mølbak K, Wegener HC. A case-control study of risk factors for sporadic Campylobacter infections in Denmark. Epidemiol Infect 2003;130:353-66.
- Cree L, Cowden J, Morris G. The evaluation of a new standard data set on reported cases of intestinal infectious disease in Scotland, and recommendations for the future. Int J Environ Health Res 2001;11:329-35.

13. Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, et al. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 2004;38(Suppl 3):S285–96.
14. McDowell DA, Megraud F, Millar BC, Mahony RO, Riordan LO, Rourke MO, et al. *Campylobacter*. *Vet Res* 2005;36:351–82.
15. Van Pelt W, de Wit MA, Wannet WJ, Ligtvoet EJ, Widdowson MA, van Duynhoven YT. Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in the Netherlands, 1991–2001. *Epidemiol Infect* 2003;130:431–41.
16. Puylaert JB, Van der Zant FM, Mutsaers JA. Infectious ileocectitis caused by *Yersinia*, *Campylobacter*, and *Salmonella*: clinical, radiological and US findings. *Eur Radiol* 1997;7(1):3–9.
17. Van Noyen R, Selderslaghs R, Bekaert J, Wauters G, Vandepitte J. Causative role of *Yersinia* and other enteric pathogens in the appendicular syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10(9):735–41.
18. Pönkä A, Pitkänen T, Kosunen TU. *Campylobacter* enteritis mimicking acute abdominal emergency. *Acta Chir Scand* 1981; 147(8):663–6.
19. Instruction Manual. Part 2g. Data Entry Instructions for the Mortality Medical Indexing, Classification, and Retrieval System (MICAR), 1996-1997. U.S. Department of Health and Human services. Public Health Service Centers for Disease Control National Center for Health Statistics. Hyattsville, Maryland; May 1996; p. 9–14.
20. Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachmkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2000. p. 121.
21. Nachamkin I. *Campylobacter*, *Helicobacter*, and related spiral bacteria. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1996. p. 402–9.