دراسة بعض عوامل ضراوة بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة من حالات مرضية مختلفة

م . م . عباس ياسين حسن جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة
أ . د . عباس عبود فرحان جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة
أ . م . د . وعد محمود رؤوف جامعة تكريت / كلية العلوم

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة خلال الفترة من بداية آذار الى نهاية أيلول 2009 في مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول للولادة والاطفال في مدينة بعقوبة ، جمعت 310 عينة سريرية مختلفة لكل الاعمار وكلا الجنسين . أظهرت نتائج الفحوصات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية عائدية 28 عزلة (9 %) لنوع *E. faecalis* ، وتم تقييم قدرة العزلات على انتاج بعض عوامل الضراوة ، إذ بينت النتائج قابلية هذه العزلات على الالتصاق بالخلايا الظهارية للجهاز البولي للإنسان بنسبة (93%) ، وإنتاجها لإنزيم الهيمولايسين بنسبة (28.6%) ، وإنزيم الجلاتينيز بنسبة (43%) ، وإنزيم اللايبيز بنسبة (10.7 %) ، وانتاج المحفظة بنسبة (35.7%) .

كلمات مفتاحية: اصابة , عوامل الضراوة , ممرض , المكورات المعوية البرازية .

المقدمة

توجد المكورات المعوية Enterococci كنبيت طبيعي (Normal flora) في القناة المعدية المعوية والجهاز التناسلي الأنثوي وفي تجويف فم الإنسان واغلب الحيوانات , وتقطن التربة والمياه والنباتات والأطعمة المتخمرة [1] .

يضم جنس المكورات المعوية العديد من الأنواع , وأبرزها النوع *E. faecalis* المسؤول تقريبا عن (80 - 90)% من الاخماج السريرية المتسببة عن المكورات المعوية التي تصيب الإنسان[2] , وان أمراضيتها مرتبطة بقدرتها على إنتاج العديد من عوامل الضراوة التي تشمل السايتولايسين والإنزيم حال للدم وفرمون الجنس وعوامل الالتصاق والجلاتينيز والبكتريوسين وغيرها [3] , وأشارت بعض الدراسات الحديثة إلى إن بعض السلالات المرضية لها القدرة على إنتاج المحفظة (Capsule)[4] , وامتلاكها إنزيم اللايبيز(Lipase) وعوامل التلازن (Haemagglutinins) [5] , كما وجد إن بعض سلالات *E. faecalis* المعزولة من المرضى المصابين بسرطان القولون والمستقيم تنتج السوبر اوكسايد الخارج خلوي (Extracellular superoxide) [6] .

نالت هذه الجراثيم اهتماما كبيرا من قبل الباحثين والمختصين في الوقت الحاضر مما جعلها هدفا أساسيا للبحوث والدراسات الحديثة , فقد أصبحت ضمن مجموعة الممرضات الانتهازية (Opportunistic pathogens) المسببة للعديد

من الحالات المرضية للإنسان مثل التهاب شغاف القلب واخماج المسالك البولية والتجرثم الدموي واخماج التجويف ألبطني والحوضي واخماج جروح العمليات وتعفن دم الأطفال حديثي الولادة وقليلا ما تسبب التهاب السحايا [7] .

وقد صممت الدراسة الحالية لتسليط الضوء على هذه الجرثومة لتحقيق الاهداف التالية:

1- عزل النوع E. faecalis من مصادر سريرية مختلفة .
2- تشخيص العزلات قيد الدراسة من خلال الخصائص والصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية .
3- تقييم قدرة العزلات على إنتاج بعض عوامل الضراوة مثل إنتاج الهيمولايسين , الجلاتينيز , اللايبيز , المحفظة , عامل الالتصاق .

طرائق العمل

الكشف عن عوامل الضراوة

الكشف عن إنتاج الجلاتينيز

لقح وسط اختبار تميع الجلاتين بالعزلات الجرثومية وحضنت الأنابيب الملقحة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 3 أيام ، ثم وضعت بدرجة حرارة 4 م° لمدة 30 دقيقة . أن تحلل الجلاتين وتحوله إلى سائل دلالة على النتيجة الموجبة بعد مقارنة النتائج مع أنبوبة السيطرة غير الملقحة بالجرثومة [8] .

الكشف عن إنتاج الهيمولايسين

لقحت العزلات الجرثومية بطريقة التخطيط على سطح وسط أكار نقيع القلب والدماغ ـ الدم وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48 ساعة . قرأت النتائج بملاحظة التحلل حول المستعمرات فيما إذا كان كامل (β – hemolysis) أو جزئي أو غير محللة للدم[9] .

الكشف عن إنتاج اللايبيز

تم الكشف عن هذا الإنزيم بإتباع الطريقة المذكورة من قبل Cruickshank وجماعته[8] وكالآتي : لقح وسط مح البيض الصلب بلقاح العزلات الجرثومية لكل موقع ، إذ حددت خمسة مواقع بشكل خطوط على كل طبق، حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48 – 72ساعة. أن ظهور عتمة حول المستعمرات النامية دلالة على النتيجة الموجبة من خلال تحلل الدهون بفعل إنزيم اللايبيز .

اختبار الالتصاق على الخلايا الظهارية البولية للإنسان

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Guzman وجماعته [10] والتي تتضمن مايلي :

1- تحضير عالق الخلايا الظهارية للإنسان :

أخذت عينات الإدرار لنساء غير مصابات بأخماج المسالك البولية ونبذت بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ، غسل الراسب الحاوي على الخلايا الظهارية بمحلول داريء الفوسفات الملحي أربع مرات ثم علقت الخلايا بالداريء نفسه . وتم التأكد من عدم وجود خلايا جرثومية ملتصقة بالخلايا الظهارية المحضرة أعلاه من خلال الفحص المجهري باستخدام شريحة عدّ الخلايا (Chamber slide) ، فإذا كان عدد الجراثيم الملتصقة 2 لكل 40 خلية ظهارية فأن العينة تعد غير صالحة لأجراء الاختبار .

2- اختبار الالتصاق الجرثومي :

مزج 0.5 مل من المزروع الجرثومي بعمر 24 ساعة والمحضر في وسط نقيع القلب والدماغ السائل مع 0.5 مل من عالق الخلايا الظهارية ، ثم حضن المزيج بدرجة حرارة 37°م لمدة 60 دقيقة مع التحريك كل 10 دقائق ، وبعدها غسل المزيج أربع مرات باستخدام محلول داريء الفوسفات الملحي مع تكرار النبذ المركزي وذلك من أجل التخلص من الجراثيم غير الملتصقة بالخلايا الظهارية .

وضعت قطرة صغيرة من المزيج النهائي على شريحة زجاجية نظيفة وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ، ثم ثبتت بإمرارها على اللهب بسرعة وصبغت بصبغة كرام ، وفحصت تحت العدسة الزيتية لملاحظة الجراثيم الملتصقة على الخلايا الظهارية .

الكشف عن وجود المحفظة

استخدمت طريقة الحبر الهندي (Indian ink method) للكشف عن قابلية العزلات الجرثومية على تكوين المحفظة . أخذت مستعمرة من كل عزلة جرثومية بواسطة ناقل معقم (Loop) ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة ثم أضيف إليها قطرة من الحبر الهندي ، مزجت ثم نشر المزيج على سطح الشريحة وترك ليجف بالهواء وبعدها فحصت بالعدسة الزيتية للمجهر . عدّت ملاحظة مناطق شفافة ضمن خلفية سوداء دلالة على وجود المحفظة (اختبار موجب) [11].

النتائج والمناقشة

الكشف عن عوامل الضراوة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عزلات *E. faecalis* قد أنتجت بعض من عوامل الضراوة المدروسة وكما موضح في الجدول (1) .

جدول (1) إنتاج عوامل الضراوة من قبل عزلات *E. faecalis* قيد الدراسة

عامل الضراوة	عدد العزلات الموجبة (28)	(%)
عامل الالتصاق الجرثومي	26	92.8
إنزيم الهيمولايسين	8	28.6
إنزيم الجلاتينيز	12	42.8
إنزيم اللاييز	3	10.7
المحفظة	10	35.7

عامل الالتصاق

أظهرت النتائج قيد الدراسة أن 26 عزلة وبنسبة (92.8%) من جراثيم *E. faecalis* لها القدرة على الالتصاق بالخلايا الظهارية للجهاز البولي لأشخاص أصحاء .

جاءت هذه النتيجة متفقة مع عدد من الدراسات مثل الدراسة المحلية للباحثة السعدي [12] ألتي أشارت إلى قابلية جراثيم *E. faecalis* المعزولة من أخماج المسالك البولية على الالتصاق بالخلايا الظهارية للجهاز البولي بنسبة (100%) ، وهذا ما أكدته دراسة Joyanes وآخرين [13] من أن هذه الجراثيم لها القابلية على الالتصاق بالخلايا الظهارية للجهاز البولي ، في حين أوضحت دراسة Guzman وآخرين [14] أن لهذا النوع الجرثومي القدرة أيضاً على الالتصاق بخلايا الصمامات القلبية .

ويعزى السبب في قابلية جراثيم المكورات المعوية البرازية على الالتصاق بخلايا وأنسجة المضيف إلى امتلاكها بعض عوامل الالتصاق كالمستضدات الموجودة على سطح الخلايا الجرثومية مثل الكاربوهيدرات السطحية (Surface carbohydrates) والبروتينات السطحية (Surface proteins) [15] أو قد يعود السبب إلى وجود Lipoteichoic acid الذي يعمل كمستضد ويساعد الخلايا الجرثومية على الالتصاق بخلايا وأنسجة المضيف [16] .

إنتاج الهيمولايسين

أظهرت النتائج الحالية المبينة في جدول (1) أن 8 عزلات فقط بنسبة (28.6%) من جراثيم المكورات المعوية البرازية لها القابلية على إنتاج إنزيم الهيمولايسين ، إذ كان 6 عزلات منها أي بنسبة (21.4%) ذات تحلل كامل للدم (بيتا) وعزلتين أي بنسبة (7.2%) ذات تحلل جزئي للدم (ألفا) ، بينما لم تحلل الدم (كاما) باقي العزلات وكما موضح في الجدول (2) .

جدول (2) إنتاج الهيمولايسين من قبل عزلات *E. faecalis* قيد الدراسة

نوع تحلل الدم (الهيمولايسين)	عدد عزلات *E. faecalis* المحللة للدم	النسبة المئوية (%)
غير محللة للدم (γ)	20	71.4
تحلل تام للدم (β)	6	21.4
تحلل جزئي للدم (α)	2	7.2
المجموع	28	100

وجاءت هذه النتيجة متفقة مع دراسة Aberna و Prabakaran [3] التي ذكرت أن 31% من جراثيم *E. faecalis* المعزولة من حالات سريرية مختلفة كانت منتجة لإنزيم الهيمولايسين ، كما بينت نتائج Coque وآخرون [17] أن 55 عزلة بنسبة 29% من مجموع 192 عزلة من هذه الجرثومة كانت منتجة لإنزيم الهيمولايسين . غير أن بعض الدراسات أشارت إلى أن عزلات هذا النوع الجرثومي لها القابلية على إنتاج هذا الإنزيم بنسبة عالية ، حيث أشارت دراسة Furumura وآخرون [18] إلى أن نسبة العزلات المنتجة لهذا الإنزيم والمعزولة من حالات سريرية هي (75 %).

إن إنتاج هذا الإنزيم من قبل جراثيم المكورات المعوية البرازية يعد من عوامل الضراوة المهمة التي تشجع الجرثومة على استعمار خلايا وأنسجة المضيف وأحداث الاخماج[5] .

وقد يعزى إنتاج الهيمولايسين في بعض الأحيان وعدم إنتاجه في أحيان أخرى إلى الجينات المشفرة لهذا الإنزيم في عزلات المكورات المعوية البرازية التي ربما تكون من نوع الجينات الصامتة (Silent genes) التي تشفر لإنزيم الهيمولايسين في بعض الأحيان مما يجعلها من الممرضات الانتهازية [19] .

إنتاج إنزيم الجلاتينيز

بينت نتائج الدراسة الحالية في جدول (1) أن 12 عزلة وبنسبة (42.8%) من جراثيم *E. faecalis* لها القابلية على إنتاج إنزيم الجلاتينز .

اتفقت هذه النتيجة مع ما توصلت إليه دراسة Aberna و Prabakaran [3] إلى أن إنتاج إنزيم الجلاتينيز من قبل هذه الجراثيم المعزولة من حالات سريرية مختلفة كان بنسبة (41.3 %)، بينما لم تتفق مع نتائج الدراسة المحلية للباحثة قندلا [20] التي لم تستطع أي من عزلاتها إنتاج هذا الإنزيم ، وقد يرجع السبب إلى عدم امتلاكها الجينات المشفرة لإنتاج هذا الإنزيم .

أشارت دراسة Coque وآخرون [17] إلى أهمية هذا الإنزيم الذي يمثل عامل ضراوة أساسي لجرثومة *E. faecalis* ، يساعدها على غزو خلايا وأنسجة المضيف وأحداث بعض الاخماج ، وقد ذكروا بأن عزلات هذه الجرثومة التي حصل عليها من حالات إلتهاب شغاف القلب واخماج التجرثم الدموي كانت منتجة للإنزيم بنسبة (54 و 68)% على التوالي .

إنتاج إنزيم اللايبيز

أظهرت ثلاث عزلات بنسبة (10.7%) للنوع *E. faecalis* نتيجة موجبة لهذا الفحص ، وتم قراءة النتيجة بتكون مناطق معتمة أو ضبابية حول المستعمرات النامية على وسط مح البيض الصلب (Egg yolk agar) ، ومن خلال هذه النتيجة يمكن أن نستدل بأن نسبة إنتاج هذا الإنزيم كانت واطئة بين عزلات المكورات المعوية البرازية .

لوحظ هذا الإنزيم لأول مرة في عام 1990 بين سلالات *E. faecalis* المعزولة من التربة [21] ، ولوحظ أيضاً بين عزلات هذه الجرثومة المعزولة من أخماج التجرثم الدموي من قبل الباحث Elsner وجماعته [5] الذين وجدوا أن 31 عزلة بنسبة (35%) من مجموع 89 عزلة للنوع *E. faecalis* كانت منتجة لإنزيم اللايبيز .

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت إليه الدراسة المحلية للباحث الخفاجي [22] التي أوضح فيها بأن هذه الجراثيم تنتج إنزيم اللايبيز بنسبة قليلة تصل إلى (6%) من مجموع العزلات ، وأكدت على ذلك دراسة Hallgren وجماعته [23] التي وجدوا بأن سلالات المكورات المعوية البرازية المعزولة من الأنف والإذن والحنجرة كانت لها القدرة على إنتاج هذا الإنزيم بنسبة (2.8%) ، بينما السلالات المعزولة من الجلد والأنسجة الرطبة كان لها القدرة على إنتاج الإنزيم بنسبة (13%) ، في حين أشارت دراسة Furumura وجماعته [18] إلى النسبة العالية لإنتاج هذا الإنزيم بين عزلات هذه الجرثومة المعزولة من حالات سريرية مختلفة والتي بلغت 23 عزلة بنسبة (71.8%) من مجموع 32 عزلة من جرثومة *E. faecalis* ، وبينت هذه الدراسة الأهمية الكبيرة لهذه الإنزيمات في أحداث الإصابات المختلفة والناتجة عن هذا النوع من الجراثيم .

إنتاج المحفظة

بينت نتائج الدراسة الحالية وكما في جدول (1) أن 10 عزلات أي بنسبة (35.7%) من جراثيم *E. faecalis* كانت منتجة للمحفظة ، إذ ظهرت تحت المجهر الضوئي بشكل مناطق شفافة ضمن خلفية سوداء . وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصل إليه الباحث Huebner وجماعته [24] الذين وجدوا أن 5 عزلات وبنسبة (33%) من مجموع 15 عزلة لجراثيم النوع *E. faecalis* المرضية كانت لها القدرة على إنتاج المستضد الخاص بالمحفظة.

أن خاصية تكوين المحفظة من قبل جراثيم المكورات المعوية لم تكن معروفة مسبقاً إلى أن توصل إليها الباحث Bottone وجماعته [11] حيث بينوا وجود المحفظة من خلال تحضيرات الحبر الهندي المحورة لسلالات المكورات المعوية البرازية المعزولة من أخماج المسالك البولية ، كما أشاروا إلى أن هذه العزلات ذات قدرة على إنتاج مستعمرات مخاطية القوام على وسط آكار الدم ، وتمكنوا أيضاً من الكشف عن وجود المحفظة في سلالتين للنوع *E. faecalis* المعزولة من أخماج المسالك البولية مستعملين صبغة (Mucicarmine) التي أظهرت المحفظة بشكل هالة وردية اللون حول الجرثومة .

المصادر

1. Fisher, K. and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiol., 155 : 1749 – 1757 .
2. Mohanty, S. ; Jose, S. ; Singhal, R. ; Sood, S. ; Dhawan, B. ; Das, B. K. et al. (2005). Species prevalence and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated in a tertiary care hospital of North India. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health., 36 (4) : 962 – 965 .
3. Aberna, R. A. and Prabakaran , K. (2011) . Evaluation for the association of virulence determinants among *E .faecalis* with its clinical outcome . Int. J . Biol. Med. Res., 2 (2) : 523 – 527 .
4. Theilacker, C. ; Sava, I. ; Sanchez – Carballo, P. ; Bao, Y. ; Kropec, A. ; Grohmann, E. ; Holst, O. and Huebner, J. (2011) . Deletion of the glycosyltransferase *bgsB* of *Enterococcus faecalis* leads to a complete loss of glycolipids from the cell membrane and to impaired biofilm formation. BMC Microbiol., 11 : 67 .

5. Elsner, H. A. ; Sobottka, I. ; Mack, D. ; Claussen, M. ; Laufs, R. and Wirth, R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 19 : 39 – 42 .
6. Balamurugan, R. ; Rajendiran, E. ; George, S. ; Samuel, G. V. and Ramakrishna , B. S. (2008) . Real – time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate – producing bacteria , Desulfovibrio and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. J. Gastroenterol . Hepatol., 23 (8 Pt 1) : 1298 – 1303 .
7. Sood, S. ; Malhotra, M. ; Das, B. K. and Kapil, A. (2008) . Enterococcal infections and antimicrobial resistance. Indian J. Med. Res., 128 : 111 – 121 .
8. Cruickshank, R. ; Dujuid, J. P. ; Marmoin, B. P. and Swain, R. H. A. (1975). Medical Microbiology. 12th ed. Vol. 2. Churchill Livingstone, Edinburg, London and New York .
9. Goering, R. V. ; Dockrell, H. M. ; Wakelin, D. ; Zuckerman, M. ; Chiodini, P. L. ; Roitt, I. M. and Mims, C. (2008). Medical Microbiology. 4th ed. Mosby Co. USA .
10. Guzman, C. A. ; Pruzzo, C. ; Lipira, G. and Calegari, L. (1989). Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. Infect. Immun., 57(6):1834 – 1838.
11. Bottone, E. J. ; Patel, L. ; Patel, P. and Robin , T. (1998) . Mucoid encapsulated *Enterococcus faecalis* an emerging morphotype isolated from patients with urinary tract infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 31 : 429 – 430 .
12. السعدي ، فاطمة صبيح علي (2007). دراسة مقاومة بكتريا *Enterococcus faecalis* المسببة لإلتهابات المجاري البولية لبعض المضادات الحيوية وإنتاجها لإنزيمات β - Lactamase . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – الجامعة المستنصرية .
13. Joyanes, P. ; Pascual, A. ; Martinez – Martinez, L. ; Hevia, A. and Perea, E. (2000). In vitro adherence of *E. faecalis* and *E. faecium* to urinary catheters. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 19 (2) : 124 – 127 .
14. Guzman, C. A. ; Pruzzo, C. ; Plate, M. ; Guardati, M. and Calegari, L. (1991). Serum dependent expression of *Enterococcus faecalis* adhesion involved in the colonization of heart cells. Microbiol. Pathol., 11 : 399 – 409 .

15. Bohle, L. A. ; Riaz, T. ; Egge – Jacobsen, W. ; Skaugen, M. ; Busk , O. L . ; Eijsink, V. G. and Mathiesen, G. (2011) . Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. BMC. Genomics., 12 : 135 .

16. Theilacker, C. ; Kaczynski, Z. ; Kropec, a. ; Fabretti, F. ; Sange, T. ; Holst, O. and Huebner, J. (2006) . Opsonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. Infect. Immun., 74 (10) : 5703 – 5712 .

17. Coque, T. M. ; Patterson, J. E. ; Steckelberg, J. M. and Murray, B. E. (1995) . Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregation substance among Enterococci isolated from patients with endocarditis and other infection and from feces of hospitalized and community based persons. J. Infect. Dis., 171 : 1223 – 1229 .

18. Furumura, M. T. ; Figueiredo, P. M. ; Carbonell, G. V. ; Darini, A. L. and Yano, T. (2006). Virulence – associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. Braz. J. Microbiol., 37 : 230 – 236 .

19. Semedo, T. ; Santos, N. A. ; Martins, P. ; Lopes, M. F. ; Marques, J. F. ; Tenrevo, R. and Crespo, T. B. (2003) . Comparative study using type strains and clinical and food isolate to examine hemolytic activity and occurrence of the *cy*l operon in enterococci. J. Clin. Microbiol., 41 (6) : 1 – 37 .

20. قندلا ، نهى جوزيف نجيب (2006) . إنتاج وتنقية وتوصيف الانتروسين المنتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* ألمعزولة محلياً من مصادر سريرية مختلفة . أطروحة دكتوراه فلسفة ، كلية العلوم – الجامعة المستصرية.

21. Kar, M. K. ; Ray, L. and Chattopadhyay, P. (1996). Isolation and identification of alkaline thermostable lipase producing microorganisms and some properties of crude enzyme. Indian. J. Experimental. Biol., 34 : 535 – 538 .

22. الخفاجي ، جواد كاظم طراد (2006) . دراسة بكتريولوجية ووراثية لبعض عزلات *Enterococcus faecalis* المعزولة من النبيت الطبيعي ومن مصادر سريرية وبيئية في محافظة بابل . أطروحة دكتوراه فلسفة ، كلية العلوم – الجامعة المستنصرية .

23. Hallgren, A. ; Abednazari, H. ; Ekdahl, C. ; Hanberger, H. ; Nilsson, M. ; Samuelsson, A. ; Sevensson, E. ; Nilsson, L. and the Swedish Intensive Care Unit (ICU) study group.

(2001). Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in ICU in Sweden evaluated by different MIC break point systems. J. Antimicrob. Chemother., 48 : 53– 62 .

24. Huebner, J. ; Wang, Y. ; Krueger, W. A. ; Madoff, L. C. ; Martirosian, G. ; Boisot, S. ; Goldmann, D. A. ; Kasper, d. L. ; Tzianabos, A. O. and Pier, G. B. (1999). Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. Infect. Immun., 67 (3):1213–1219 .