

Sepsis por *Edwardsiella tarda* y asociación con anemia falciforme: reporte de caso y revisión de la literatura

Rubén Darío Amorocho Pérez¹, Andrés García Ramírez²

Resumen: *Edwardsiella tarda* es un bacilo Gram negativo, de la familia *Enterobacteriaceae*; comúnmente hallado como agente infeccioso de peces y otros animales principalmente relacionados con medios acuáticos. Es una rara causa de enfermedad en humanos, asociándose a diferentes enfermedades infecciosas, usualmente en pacientes que presentan comorbilidades de base. Se presenta un caso de sepsis, asociado a artritis séptica, meningitis e infección urinaria por *E. tarda*, en un paciente con anemia falciforme; así mismo se realizó una revisión de la literatura.

Palabras clave: *Edwardsiella tarda*, anemia falciforme, sepsis, artritis, meningitis, infección urinaria.

Amorocho-Pérez RD, García-Ramírez A. Sepsis por *Edwardsiella tarda* y asociación con anemia falciforme: reporte de caso y revisión de la literatura. Medicina & Laboratorio 2008; 14: 43-48.

Módulo 21 (Casos clínicos), número 5. Editora Médica Colombiana S.A., 2008®.

Recibido el 10 de diciembre, 2007; aceptado el 21 de diciembre, 2007.

Presentación del caso

Paciente de 21 años, género masculino, estudiante universitario, procedente de zona urbana del municipio de Quibdó, departamento del Chocó, Colombia, quien ingresa por cuadro clínico de 3 días de evolución de malestar general, cefalea, fiebre no cuantificada, dolor intenso en rodilla izquierda que se exacerba al caminar y que compromete todo el miembro inferior; además, dolor con la movilización del hombro izquierdo.

Antecedentes personales: anemia falciforme diagnosticada a los 9 meses en Medellín. Crisis dolorosa a los 5 años. Síndrome de dolor torácico agudo a los 20 años; desde ese momento en tratamiento con ácido fólico e hidroxiurea. Transfusión en hospitalizaciones previas (no sabe más detalles). Exanguinotransfusión 6 meses antes del ingreso.

Antecedentes familiares: padres con hipertensión arterial. Hermana fallecida con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico.

Revisión de sistemas: se interroga al paciente sobre contacto con peces o animales de ambientes acuáticos, consumo de peces crudos, hábito por la pesca o salida a ríos o al mar; siendo todos estos antecedentes negativos. Sólo refiere 2 semanas previas al inicio del cuadro la

¹ Médico Residente de Medicina Interna. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. rubendap@hotmail.com

² Médico Especialista en Medicina Interna. Universidad de Antioquia. Hospital Universitario San Vicente de Paúl. Medellín, Colombia.

presencia de una enfermedad diarreica aguda autolimitada pero con manejo casero con tetraciclina oral.

Examen físico de ingreso: se encuentra paciente afebril, hemodinámicamente estable con escleras ictericas, examen toracoabdominal sin datos relevantes. Dolor en el hombro y rodilla izquierda que empeoraba con la movilización. En rodilla izquierda edema, calor y dolor.

Se considera por servicio de urgencias cuadro de anemia falciforme asociado con probable crisis hemolítica y con cuadro vasooclusivo. Se solicita evaluación por el servicio de Medicina Interna. Evaluado por servicio de Medicina Interna, se solicitan paraclínicos para estudio de síndrome febril y artrocentesis de rodilla para estudio de probable foco séptico articular; se encuentra en evolución posterior presencia de rigidez de nuca, por lo que se decide realizar además punción lumbar. De otra parte, se trasfunde por presencia de anemia importante. Los resultados obtenidos en el examen de ingreso se enumeran en la **tabla 1**.

Evolución: se inicia cobertura antibiótica de forma empírica con ceftriaxone a dosis de 1 g cada 12 horas. Se solicita evaluación al servicio de ortopedia donde se considera realizar artrotomía de rodilla izquierda y biopsia, y artrocentesis de hombro izquierdo. Los resultados de la punción lumbar y de la artrocentesis de rodilla izquierda se muestran en las **tablas 2 y 3**, respectivamente. Además, se realiza citoquímico de orina que evidencia abundantes bacterias con escasa respuesta leucocitaria. Se considera probable bacteriuria asintomática y se realiza un urocultivo para tipificar gérmenes. Dos días después de ser tomadas las muestras, se aísla *Edwardsiella tarda* multisensible (ver antibiograma en **tabla 4**) a partir de los hemocultivos, del cultivo de líquido sinovial, del líquido cefalorraquídeo y del urocultivo.

Tabla 1. Resultados de los exámenes de ingreso

Estudio	Día 0	Día 1
Hematocrito (%)	21,5	18,9
Hemoglobina (g/dL)	7,3	6,7
Leucocitos por μ L		8800
Polimorfonucleares neutrófilos (%)		88
Linfocitos (%)		10
Plaquetas por μ L		195.000
Proteína C reactiva (mg/dL)		22,9
Eritrosedimentación (mm/h)	46	64
BUN (mg/dL)	13	
Creatinina (mg/dL)	0,8	
Alanino aminotransferasa (U/L)	17	
Aspartato aminotransferasa (U/L)	46	
Bilirrubina total (mg/dL)	10,4	
Bilirrubina directa (mg/dL)	2,1	

Tabla 2. Resultados de la punción lumbar

pH	Alcalino
Proteínas (g/dL)	39,6
Glucosa (mg/dL)	80
Leucocitos por μ L	9
Polimorfonucleares por μ L	4
Mononucleares por μ L	5
Adenosin desaminasa, ADA (μ g/dL)	1,5
KOH	negativo
Coloración de Gram	Negativo para bacterias, polimorfonucleares escasos, mononucleares escasos

Tabla 3. Resultados de la artrocentesis

pH	7,5
Proteínas (g/dL)	2,1
Glucosa (mg/dL)	2
Leucocitos por μ L	132.000
Polimorfonucleares (%)	98
Mononucleares (%)	2
KOH	negativo
Coloración de Gram	Negativo para bacterias, polimorfonucleares abundantes, mononucleares escasos

Tabla 4. Antibiógrama de urocultivo, hemocultivos, cultivo de líquido articular y cultivo de líquido cefalorraquídeo

Antibiótico	Concentración inhibitoria mínima (MIC)	Resultado
Amikacina	4	sensible
Ampicilina	< 2	sensible
Ampicilina/sulbactam	< 2	sensible
Aztreonam	< 1	sensible
Cefazolina	< 4	sensible
Cefepime	< 1	sensible
Cefofetan	< 4	sensible
Ceftazidime	< 1	sensible
Ceftriaxone	< 0,5	sensible
Ciprofloxacina	< 0,25	sensible
Ertapenem	< 0,5	sensible
Gentamicina	2	sensible
Imipenem	< 1	sensible
Levofloxacim	< 0,25	sensible
Nitrofurantoina	< 16	sensible
Piperacilina/tazobactam	< 4	sensible
Tobramicina	< 1	sensible
Trimetropim/sulfa	< 20	sensible

tivo. Se descarta endocarditis con ecocardiografía transesofágica; se descartan abscesos cerebrales con TAC de cráneo simple y contrastado; otros compromisos abdominales con TAC contrastado de abdomen, el cual evidencia como hallazgos hepatomegalia, nefromegalia, quistes renales, imágenes compatibles con nefronia y parénquima esplénico disminuido. La evolución posterior es tórpida, con períodos de fiebre intermitente, por lo que se requiere nuevo lavado quirúrgico por ortopedia, obteniendo cultivos negativos para infección. Se valora por servicio de Imaginología y no se encuentran colecciones susceptibles de drenaje en riñón.

Ante la persistencia de la fiebre se solicita evaluación al servicio de Enfermedades Infecciosas donde se considera hacer ajuste de dosis a 1 g IV cada 6 horas, añadiendo además amikacina 750 mg IV por día (dosis luego ajustada por este servicio a 1g cada día). También se considera descartar otros sitios de inflamación ósea con gammagrafía de 3 fases con Tc 99, en la cual sólo se evidencia inflamación de la rodilla izquierda. Se descarta además por pruebas de laboratorio virus de inmunodeficiencia humana VIH, hepatitis B y C. El paciente muestra buena evolución con antibioticoterapia instaurada, con descenso de los reactantes de fase aguda. Los urocultivos y hemocultivos de control son negativos. Se considera suspender la amikacina después de 1 semana y completar 28 días de ceftriaxone. Valorado por fisiatría se inicia manejo de rehabilitación de rodilla. Presenta nueva disminución de la hemoglobina, por lo que se trasfunde con dos unidades de glóbulos rojos empaquetados. La **tabla 5** muestra el último control de exámenes paraclínicos. Paciente no vuelve a presentar picos febriles ni signos de respuesta inflamatoria sistémica, se da de alta al terminar el ciclo de antibióticos.

Discusión

Edwardsiella tarda es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia de las enterobacterias, nombrada así en 1965, luego de haber recibido los nombres de biotipo 1483-59, grupo Akazusa y Grupo Bartolomew [1, 2]. Comparte su género con otras dos especies: La *E. hoshinae* germen habitual encontrado en diferentes tipos de peces, aves y en heces humanas de forma ocasional, y

Tabla 5. Resultados de los de últimos exámenes paraclínicos	
Estudios	Día 17
Hematocrito (%)	28,6
Hemoglobina (g/dL)	9,2
Leucocitos por µL	10.700
Polimorfonucleares neutrófilos (%)	70
Linfocitos (%)	13
Plaquetas por µL	808.000
Eritrosedimentación (mm/h)	69
Creatinina (mg/dL)	0,7

sin asociación demostrada con infección [3]; y la *E. ictaluri*, germen asociado con enfermedad casi exclusivamente en peces, principalmente en bagres [4].

E. tarda, es un germen con amplia distribución principalmente en aguas dulces y en los animales que habitan éstas, incluyendo animales de sangre fría (peces, anguilas, serpientes, tortugas, lagartos y sapos, entre otros) y animales de sangre caliente (aves, perezosos, zarigüeyas, manatíes, ganado vacuno y porcino, entre otros) [5], pudiéndose encontrar también en ecosistemas marinos [6], incluso en la Antártica [7], asociándose con infecciones en pingüinos. En Colombia, se ha informado la presencia de este germen en especies utilizadas en la piscicultura como la tilapia roja, el bagre y la carpa, siendo asociado con edwardsiellosis, una enfermedad mortal para los peces [8].

La presencia de *E. tarda* en humanos se ha evaluado en múltiples artículos alrededor del mundo [9-32]. Se considera un germen que puede encontrarse como hallazgo incidental en los cultivos de heces en pacientes asintomáticos, como lo muestra un estudio realizado en Panamá, entre 1965 y 1972, por Kourany y colaboradores, el cual muestra una prevalencia de 1% de cultivos positivos en heces en habitantes de la población rural, quienes se encontraban asintomáticos [11]; así mismo, se ha reportado como agente responsable de enfermedad intra y extraintestinal [19]. Teniendo en cuenta la información clínica y los reportes de casos alrededor del mundo, se ha considerado a *E. tarda* como un germen que comparte los patrones clínicos de la salmonellosis, con bacteremia con o sin foco claro identificado, la gastroenteritis, un patrón tipo fiebre tifoidea, o un estado de portador asintomático [2, 9].

Desde el punto de vista gastrointestinal, *E. tarda* se ha asociado con gastroenteritis leve y usualmente autolimitada [6]; sin embargo, hay reportes de casos de enterocolitis invasiva [13], colitis ulcerativa [30] y enfermedades con patrones de fiebres entéricas similares a la fiebre tifoidea [2].

Extraintestinalmente, *E. tarda* se ha aislado prácticamente de todas las secreciones corporales y de material purulento de abscesos de todas las localizaciones [12, 29]. Se encuentran asociaciones de *E. tarda* con bacteremia con o sin foco inicial aparente [10, 26], infección del tracto urinario [19], endocarditis [25], meningitis [9], peritonitis, abscesos hepáticos [15, 20, 33], celulitis e infección de tejidos blandos [18, 27], infecciones del tracto biliar [21], empiema [31], absceso tubo-ovárico [24], absceso de glándula de Bartholin y perirrectal [27], artritis séptica y osteomielitis [22], y hasta con endometritis puerperal [28]. Además, se encuentra asociada con infección de heridas y quemaduras [22].

Los informes de casos publicados evidencian una relación entre *E. tarda* y otras enfermedades concomitantes del paciente, que incluyen enfermedades hepáticas [23] (cirrosis, hepatitis C, colelitiasis, alcoholismo, hepatocarcinoma [31]), hematológicas (leucemia [16, 34], anemia falciforme [9, 17]) y enfermedades sistémicas [29] (diabetes mellitus [35], neoplasias de órganos sólidos [31], asma, enfermedad ácido péptica, insuficiencia renal crónica y SIDA [25]). Las infecciones por *E. tarda* también se asocian con hábitos como la pesca [18], la cría de peces [36], el consumo de peces crudos [24], contacto con mascotas [14] o el simple hecho de bañarse con agua contaminada [32]. No hay casos informados en Colombia de infección por *E. tarda* para evaluar posibles asociaciones en nuestro medio.

Los factores de virulencia relacionados con la infección severa por *E. tarda* en animales y humanos se han evaluado en diversos estudios [37, 38], siendo la presencia de hemolisinas y sideróforos, como métodos de obtención del hierro, los más analizados [22]; también se ha encontrado

presencia de citolisinas asociadas con lisis de células epiteliales intestinales [39, 40], la presencia de catalasas y la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos [37, 39].

En cuanto al manejo de *E. tarda*, este germen comparte la resistencia natural de las enterobacteriaceas a la penicilina. Además, presenta resistencia natural a la clindamicina, la colistina, la eritromicina, la rifampicina y el ácido fusídico [41, 42]. Los reportes de casos mencionan altos niveles de sensibilidad a los demás antibióticos [43]; sin embargo, hay reportes de resistencia a las cefalosporinas, los aminoglicósidos, las fluoroquinolonas y el aztreonam [32, 34].

En el presente caso no se pudo hallar una causa directa para explicar el origen del germen, pero es probable una asociación con consumo de agua contaminada. La sintomatología descrita es característica de una artritis séptica, pero con el hallazgo de *E. tarda* en líquido cefalorraquídeo, en orina y en sangre, hallazgos que no se han reportado en estudios previos, se demuestra la facilidad de este patógeno para diseminarse en pacientes con anemia falciforme, como ya se comentó previamente [9, 17].

La persistencia de los picos febriles al inicio del cuadro, se asocia probablemente con una dosis subóptima de ceftriaxone, mostrando rápidamente mejoría al cambiar el esquema usado. La sensibilidad de esta bacteria a los antibióticos permitió un manejo adecuado sin complicaciones. En la literatura se mencionan índices de mortalidad de hasta el 40% para las manifestaciones extraintestinales de dicho germen [22, 29].

En conclusión, *E. tarda* es un germen poco común que se encuentra en las heces de pacientes asintomáticos; sin embargo, se puede asociar con manifestaciones intra y extraintestinales en algunos pacientes, principalmente aquellos con enfermedades sistémicas de base.

Agradecimientos

Al Dr. Juan David Ramírez Barrera por su colaboración en la edición del artículo.

Summary: *Edwardsiella tarda* is Gram-negative rod, appertaining to *Enterobacteriaceae* family. It is often found as an infectious agent in fishes and other animals in relation with aquatic environment. *E. tarda* is a strange cause of infection in humans. It has been implicated in different infections, most commonly seen in patients with underlying pathologies. It was presented a clinical report of a patient with sepsis, septic arthritis, meningitis and urinary tract infection by *E. tarda* with sickle-cell anemia associated; a literature review was developed.

Key words: *Edwardsiella tarda*, sickle-cell anemia, sepsis, arthritis, meningitis, urinary tract infection.

Amorocho-Pérez, RD, García-Ramírez A. Sepsis from *Edwardsiella tarda* and link with sickle-cell anemia: case report and review of the literature. *Medicina & Laboratorio* 2008; 14: 43-48.

Module 21 (Clinical cases), number 5. Editora Médica Colombiana S.A., 2008®.

Received on December 10, 2007; accepted on December 21, 2007.

Bibliografía

1. Tamura K, Sakazaki R, McWhorter AC, Kosako Y. *Edwardsiella tarda* serotyping scheme for international use. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2343-2346.
2. Jordan GW, Hadley WK. Human infection with *Edwardsiella tarda*. *Ann Intern Med* 1969; 70: 283-288.
3. Wong JD, Miller MA, Janda JM. Surface properties and ultrastructure of *Edwardsiella* species. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1797-1801.
4. Panangala VS, Shoemaker CA, McNulty S, Arias CR, P.H. K. Intra- and interspecific phenotypic characteristics of fish-pathogenic *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. *Aquacult Res* 2006; 37:

5. Amandi A, Hiu SF, Rohovec JS, Fryer JL. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Appl Environ Microbiol 1982; 43: 1380-1384.
6. Sechter I, Shmilovitz M, Altmann G, Seligmann R, Kretzer B, Braunstein I, et al. *Edwardsiella tarda* isolated in Israel between 1961 and 1980. J Clin Microbiol 1983; 17: 669-671.
7. Curry CH, McCarthy JS, Darragh HM, Wake RA, Todd-hunter R, Terris J. Could tourist boots act as vectors for disease transmission in Antarctica? J Travel Med 2002; 9: 190-193.
8. Rey AL, Iregui CA, Verjón N. Diagnóstico clínico patológico de los brotes de enfermedad en tilapia roja. Rev Med Vet Zoot 2002; 49: 13-21.
9. Sachs JM, Pacin M, Counts GW. Sickie hemoglobinopathy and *Edwardsiella tarda* meningitis. Am J Dis Child 1974; 128: 387-388.
10. Le Frock JL, Klainer AS, Zuckerman K. *Edwardsiella tarda* bacteremia. South Med J 1976; 69: 188-190.
11. Kourany M, Vasquez MA, Saenz R. Edwardsiellosis in man and animals in Panama: clinical and epidemiological characteristics. Am J Trop Med Hyg 1977; 26: 1183-1190.
12. Clarridge JE, Musher DM, Fainstein V, Wallace RJ, Jr. Extraintestinal human infection caused by *Edwardsiella tarda*. J Clin Microbiol 1980; 11: 511-514.
13. Marsh PK, Gorbach SL. Invasive enterocolitis caused by *Edwardsiella tarda*. Gastroenterology 1982; 82: 336-338.
14. Nagel P, Serritella A, Layden TJ. *Edwardsiella tarda* gastroenteritis associated with a pet turtle. Gastroenterology 1982; 82: 1436-1437.
15. Maserati R, Farina C, Valenti L, Filice C. Liver abscess caused by *Edwardsiella tarda*. Boll Ist Sieroter Milan 1985; 64: 419-421.
16. Funada H, Kameoka J, Machi T, Matsuda T. *Edwardsiella tarda* septicemia complicating acute leukemia. Jpn J Med 1988; 27: 325-328.
17. Wilson JP, Waterer RR, Wofford JD, Jr., Chapman SW. Serious infections with *Edwardsiella tarda*. A case report and review of the literature. Arch Intern Med 1989; 149: 208-210.
18. Vartian CV, Septimus EJ. Soft-tissue infection caused by *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila*. J Infect Dis 1990; 161: 816.
19. Jaruratanasirikul S, Kalnauwakul S. *Edwardsiella tarda*: a causative agent in human infections. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991; 22: 30-34.
20. Zighelboim J, Williams TW, Jr., Bradshaw MW, Harris RL. Successful medical management of a patient with multiple hepatic abscesses due to *Edwardsiella tarda*. Clin Infect Dis 1992; 14: 117-120.
21. Walton DT, Abbott SL, Janda JM. Sucrose-positive *Edwardsiella tarda* mimicking a biogroup 1 strain isolated from a patient with cholelithiasis. J Clin Microbiol 1993; 31: 155-156.
22. Janda JM, Abbott SL. Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. Clin Infect Dis 1993; 17: 742-748.
23. Wu MS, Shyu RS, Lai MY, Huang GT, Chen DS, Wang TH. A predisposition toward *Edwardsiella tarda* bacteremia in individuals with preexisting liver disease. Clin Infect Dis 1995; 21: 705-706.
24. Pien FD, Jackson MT. Tuboovarian abscess caused by *Edwardsiella tarda*. Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 964-965.
25. Nettles RE, Sexton DJ. Successful treatment of *Edwardsiella tarda* prosthetic valve endocarditis in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1997; 25: 918-919.
26. Yang CH, Wang CK. *Edwardsiella tarda* bacteraemia--complicated by acute pancreatitis and pyomyoma. J Infect 1999; 38: 124-126.
27. Slaven EM, Lopez FA, Hart SM, Sanders CV. Myonecrosis caused by *Edwardsiella tarda*: a case report and case series of extraintestinal *E. tarda* infections. Clin Infect Dis 2001; 32: 1430-1433.
28. Mikamo H, Ninomiya M, Sawamura H, Tamaya T. Puerperal intrauterine infection caused by *Edwardsiella tarda*. J Infect Chemother 2003; 9: 341-343.
29. Wang IK, Kuo HL, Chen YM, Lin CL, Chang HY, Chuang FR, et al. Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. Int J Clin Pract 2005; 59: 917-921.
30. Engel JJ, Martin TL. *Edwardsiella tarda* as a cause of post-dysenteric ulcerative colitis. Int J Colorectal Dis 2006; 21: 184-185.
31. Mizunoe S, Yamasaki T, Tokimatsu I, Matsunaga N, Kushima H, Hashinaga K, et al. A case of empyema caused by *Edwardsiella tarda*. J Infect 2006; 53: e255-258.
32. Manchanda V, Singh NP, Eideh HK, Shamweel A, Thukral SS. Liver abscess caused by *Edwardsiella tarda* biogroup 1 and identification of its epidemiological triad by ribotyping. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 135-137.
33. Yousuf RM, How SH, Amran M, Hla KT, Shah A, Francis A. *Edwardsiella tarda* septicemia with underlying multiple liver abscesses. Malays J Pathol 2006; 28: 49-53.
34. Peyrade F, Bondiau P, Taillon B, Boscagli A, Roa M, Du-jardin P. *Edwardsiella tarda* septicemia in chronic lymphoid leukemia. Rev Med Interne 1997; 18: 233-234.
35. Osiri M, Tantawichien T, Deesomchock U. *Edwardsiella tarda* bacteremia and septic arthritis in a patient with diabetes mellitus. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 28: 669-672.
36. Vandepite J, Lemmens P, De Swert L. Human edwardsiellosis traced to ornamental fish. J Clin Microbiol 1983; 17: 165-167.
37. Tan YP, Zheng J, Tung SL, Rosenshine I, Leung KY. Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence. Microbiology 2005; 151: 2301-2313.
38. Tan YP, Lin Q, Wang XH, Joshi S, Hew CL, Leung KY. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of *Edwardsiella tarda*. Infect Immun 2002; 70: 6475-6480.
39. Strauss EJ, Ghorri N, Falkow S. An *Edwardsiella tarda* strain containing a mutation in a gene with homology to shIB and hpmB is defective for entry into epithelial cells in culture. Infect Immun 1997; 65: 3924-3932.
40. Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, Sakai M. Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 621-624.
41. Muyembe T, Vandepitte J, Desmyter J. Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda*. Antimicrob Agents Chemother 1973; 4: 521-524.
42. Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibilities of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, and *E. hoshinae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2245-2255.
43. Reinhardt JF, Fowlston S, Jones J, George WL. Comparative in vitro activities of selected antimicrobial agents against *Edwardsiella tarda*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 966-967.