بررسی پلی‌مورفیسم لکوس‌های VNTR30و VNTR36 در سرووارهای بیماری زای لپتوسپیرا در ایران

سمارضاسلطانی[۱]، پژواک خاکی[۲*]، سهیلا مرادی بیدهندی[۲]، مجید اسمعیل زاد[۳] ، مریم سادات سلطانی[۴]، شیوامدیر روستا[۱]

۱.فوق لیسانس میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲.دکترای تخصصی باکتریولوژی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج
۳.دکترای تخصصی ژنتیک ملکولی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج
۴.فوق لیسانس میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

* نشانی برای مکاتبه: کرج، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، تلفن ۰۹۱۲۳۱۹۷۲۵۸ ، samasoltani88@yahoo.com
دریافت مقاله: خرداد نود و یک پذیرش برای چاپ: مرداد نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *لپتوسپیروزیس به عنوان گسترده ترین بیماری مشترک بین حیوان و انسان مطرح است. بررسی اپیدمیولوژیکی لپتوسپیرا برای تعیین حیواناتی که مخازن متداول عفونت هستند اهمیت دارد. امروزه تکنیک MLVA برای تفرق و شناسایی سرووارهای لپتوسپیرا در بررسی های ملکولی- اپیدمیولوژیکی کاربرد دارد. هدف این مطالعه تفرق و شناسایی سرووارهای بیماری زای لپتوسپیرا در ایران می باشد.*

روش کار: *۱۲ سروار بیماری زای لپتوسپیرا و ۱ سروار ساپروفیت از بخش میکروب شناسی موسسه سرم سازی رازی کرج تهیه گردید. پس از کشت در محیط EMJH و تخلیص DNA با پرایمرهای لکوس VNTR30و لکوس VNTR36 PCR گذاشته شد. و نتایج توسط آگاروز ژل_الکتروفورز توسط مارکر+ 100bp آنالیز شد.*

یافته ها: *برای سروار غیر بیماری زا آللی برای هیچ یک از دو لکوس یافت نشد. تمام سرووارهای بیماری زا هر دو لکوس را در ژنوم خود داشتند. پلی مورفیسم جالبی را ۴ سروار Atumnalis و Hardjo St.Hardjo bovisو Pomona St. UT364 و Icterohaemorrhagia St. RGA برای لکوس VNTR30و ۳ سروار Canicola St. Hondutrecht IV و Hardjo St.Hardjo bovisو Pomona St. UT364 برای لکوس VNTR36 نشان داده اند.*

نتیجه گیری: *اکثر سرووارهای مختلف دارای الگوهای VNTR یک سان بودند این در حالی است که با سایر سرووارهای یک سان آمریکای جنوبی و اروپا تفاوت های بارزی را از نظر الگوی VNTR نشان داده اند. سرووارهای ما با سرووارهای آسیای شرقی قرابت و نزدیکی بسیاری در الگوی VNTR داشتند. بین دو سروار canicola St. Hondutrecht IV و canicola St. Fiocruz LV133 توسط سیستم PFGE هتروژنسیتی مشاهده نشد اما ما توسط تکنیک MLVA آن دو را تمایز دادیم. با توجه به پلی مورفیسم و هتروژنسیتی بین سرووارهای کار شده انتظار می رود از این تکنیک به راحتی بتوان در بررسی های اپیدمیولوژیکی – ملکولی لپتوسپیرا استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *VNTR، تکنیک MLVA، سرووارهای لپتوسپیرا*

مقدمه

باکتری لپتوسپیرا هوازی اجباری بوده و متابولیسم تنفسی دارد. این باکتری به شکل مارپیچی فنر مانند محکمی به ضخامت ۰,۱ میکرون وطول ۶ تا ۲۰ میکرون می باشد(۱). به سا دگی به وسیله حرکت چرخشی یا مارپیچی اش و قلاب مشخص که در یک یا هر دو انتهای آن است قابل تشخیص می باشد(۲). بهترین وسیله برای مشاهده این اجرام استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک می باشد. لپتوسپیروزیس به عنوان گسترده ترین بیماری مشترک بین حیوان و انسان مطرح بوده و به علت وجود گونه های مختلف لپتوسپیرا و وجود میزبان های گوناگون انتشار جغرافیایی وسیعی در طبیعت دارد. این بیماری به عنوان یک بیماری نو پدید عفونی به خصوص در نواحی معتدل و استوایی شناخته می شود(۳).

لپتوسپیرا در تمام قاره ها جز قطب جنوب یافت می شود و تقریبا در همه ی گونه های پستانداران دیده شده است. بیماری لپتوسپیروزیس مشابه سرماخوردگی است که دارای علایم تب، عرق، سردرد، دردماهیچه و درد شکمی می باشد. در مواردی هم در بیماران اختلالات کلیوی و ریوی مشاهده شده است.این بیماری در حال ظهور می تواند در سراسر جهان با شیوع گسترده به وقوع بپیوندد(۴).

بررسی اپیدمیولوژیکی این ارگانیسم برای تشخیص موارد فردی از موارد شیوع همگانی و هم چنین تعیین حیواناتی که مخازن متداول عفونت هستند و جلوگیری از گسترش ناقلین و در نهایت کنترل بیماری بسیار حائز اهمیت است. لپتوسپیرا از طریق ادرار ناقلین به محیط طبیعی ریخته می شود و توانایی بقا در خاک و آب تازه را دارد. عفونت انسانی از طریق تماس با خاک یا آب آلوده و یا تماس مستقم با حیوانات یا مایعات عفونی بدن آن ها ایجاد می شود(۶و۵).

تا کنون تکنیک های تایپینگ ملکولی گوناگونی شامل Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) (۷)و Pulse Field Gel Electrophoresis(PFGE) (۸)و Arbitrarily Primed PCR (۹)و در نهایت تکنیک Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism(FAFLP)(۱۰) برای شناسایی سروارهای Leptospira Introgans استفاده شده که هر کدام از این تکنیک ها معایب خود را از جمله قدرت تفرق پایین، فقر در تفسیر نهایی و نیازمند حجم بالا یی از کشت و انجام PCR مکرر دارند(۱۱). تکنیک جایگزین بر تکنیک های فوق تایپینگ MLVA می باشد که بر پایه ی بررسی توالی های Variable Number of Tandem Repeats(VNTR) می باشد. توالی های VNTR در واقع همان توالی های تکراری در ژنوم هستند که دارای تعداد کپی های متفاوت می باشند. باکتری های مختلفی با این تکنیک به راحتی متفرق و شناسایی شده اند. توانایی شناسایی این توالی ها در میکروارگانیسم ها بعد از سکانسینگ کل ژنوم و به وجود آمدن نرم افزار یابنده ی لکوس های VNTR به دست آمده است(۱۲). تکنیک MLVA قابل استفاده در اکثر آزمایشگاه ها می باشد زیرا هر آزمایشگاهی که دستگاه PCR و آگارز ژل الکتروفورز را داشته باشد می تواند از این تکنیک بهره ببرد. در این مطالعه هدف ما برآن است که به بررسی ۳ تا از لکوس های VNTR در سروارهای مختلف Leptospira introgans درایران بپردازیم و ببینیم که آیا این تکنیک ساده ی بر پایه ی PCRمی تواند سروارهای مختلف لپتوسپیرا را از هم تفرق دهد (۱۴و۱۳).

روش کار

این مطالعه ی توصیفی در فصل تابستان و پاییز سال ۱۳۹۰در موسسه رازی صورت گرفت. سروارهای مورد استفاده در این مطالعه از بانک میکروبی بخش میکروب شناسی موسسه سرم سازی رازی کرج تهیه گردید(جدول۱).

سروارها دارلن های حاوی محیط EMJHکه 8%سرم استریل خرگوش به آن ها اضافه شده بود، کشت داده شدند. سپس به انکوباتور 28°C منتقل شدند. دو تا سه هفته بعد از کشت از نمونه هاگسترشی بر روی لام میکروسکوپی تهیه گردید و در زیر میکروسکوپ زمینه تاریک تحرک تعداد آن ها کنترل گردید. نمونه هایی که خوب رشد کرده بودند برای مرحله بعد انتخاب و سایر نمونه ها مجدد کشت داده شدند. در مرحله بعد رسوب گیری و تخلیص DNA انجام گرفت. تخلیص DNA توسط روش فنل- کلروفرم صورت گرفت. تعیین غلظت DNA استخراج شده ۱۳ سروار و بررسی کیفیت و کمیت آن به روش اسپکتروفتومتر با دستگاه نانودراپ صورت گرفت و در تکثیر DNA از Taq پلی مراز استفاده گردید. در سیکل PCR مرحله واسرشت حرارت °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل در ادامه آن با مرحله واسرشت °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه و مرحله آنیلینگ برای پرایمرها با دمای °C ۵۵ به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت مرحله تکثیر با حرارت حدود °C ۷۰ برای ۱ دقیقه اعمال شد. تکثیر انتهایی در °C ۷۲ برای ۱۰ دقیقه انجام شد. سایز قطعات تکثیر شده با ژل آگارز ٪۲/۵ و ladder100bp با استفاده از روش manualتخمین زده شد(۱۵). پرایمرهای مورد استفاده متعلق به لکوس های VNTR30 و VNTR36 بود که توسط Slack در سال ۲۰۰۶ طراحی گردید(جدول ۲) (۱۵).

جدول ۱ : تاکسونومی سروارهای لپتوسپیرای به کار رفته در این تحقیق

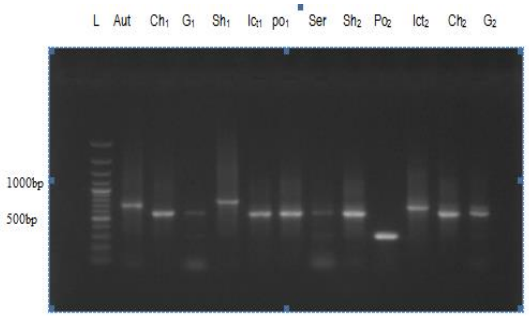
RTCC No	Species	Serogroup	Serovar	Strain	Abbreviation
۲۸۰۲	L.inerrogans	Autumnalis	Autumnalis	AkiyamiA	Aut
۲۸۰۵	L.inerrogans	Canicola	Canicola	Hondutrecht IV	Ch1
۲۸۰۸	L.inerrogans	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskava	G1
۲۸۱۰	L.introgans	Sejroe	Hardjo	Hardjo bovis	Sh1
۲۸۱۲	L.inerrogans	Icterohaemorrhagia	Icterohaemorrhagia	Verdum	Ict1
۲۸۱۵	L.inerrogans	Pomona	Pomona	Pomona	Po1
۲۸۱۷	L.inerrogans	Sejroe	Serjae serjae	M84	Ser
۲۸۱۹	L.biflexa	Semaranga	Patoc	Patoc1	Pat
۲۸۲۱	L.introgans	Sejroe	Hardjo	Hardjo prajitno	Sh2
۲۸۲۲	L.inerrogans	Pomona	Pomona	UT364	Po2
۲۸۲۳	L.inerrogans	Icterohaemorrhagia	Icterohaemorrhagia	RGA	Ict2
۲۸۲۴	L.inerrogans	Canicola	Canicola	Fiocruz LV133	Ch2
۲۸۲۵	L.inerrogans	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Andaman	G2

جدول ۲: لکوس های مورد ارزیابی در این مطالعه به همراه توالی نوکلوئیدی پرایمر

VNTR Locus	Primers(5'→3')	Year
VNTR30	F(AAGTAAGATAGGTTCGGCGTTTA) R(ACTTGGGTGTTAATCGCAAAA)	2005
VNTR36	F(TGGCGTCGAAGACAAA) R(ACTCTACCAGGAGATTATCAAA)	2006

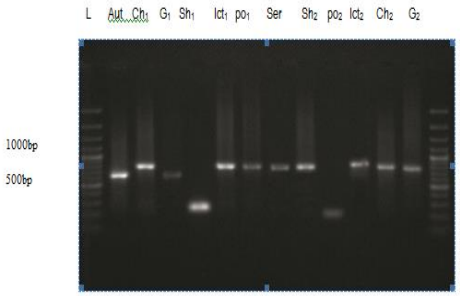
یافته ها

همه سروارهای بیماری زا لکوس های VNTR30و VNTR36را در ژنوم خود داشتند. سرووار ساپروفیت PatocI هیچ کدام از لکوس های فوق الذکر را در ژنوم خود نداشت. لکوس VNTR30 پلی مورفیسم قابل توجهی را در بعضی سروارها به نمایش گذاشت. سروارهایی که به راحتی متفرق و تفکیک شده اند شامل Atumnalis و Hardjo St.Hardjo bovisو Pomona St. UT364 و Icterohaemorrhagia St. IGA بودند (شکل ۱). سایر سروارها دامنه ی آللی یک سانی نشان دادند.



شکل۱. پلی مورفیسم لکوس VNTR30در سروارها

لکوس VNTR36پلی مورفیسم بسیار جالبی را نشان داد. اختلاف سایز آلل ها گویای این است که سروارهای Canicola St. Hondutrecht IV و Hardjo St.Hardjo bovisو Pomona St. UT364توسط این لکوس به راحتی از سایر سروارها متمایز شده اند. سایر سروارها دامنه ی آللی یک سانی را نشان دادند.



شکل۲. پلی مورفیسم لکوس VNTR36در سروارها

بحث

MLVA تکنیکی راحت، سریع با نوآوری و قدرت تشخیص بالا و بسیار مناسب برای تبادل اطلاعات بین آزمایشگاه های تشخیصی لپتوسپیرا در مطالعات مولکولی_اپیدمیولوژیکی می باشد. در واقع MLVA تکنیک ساده ی الکتروپورتیک بر پایه تکثیر DNA تلقی می گردد. این روش مبتنی بر این واقعیت می باشد که چون بیشتر ارگانیسم ها اعم از یوکاریوت و پروکاریوت دارای زنجیره ای از سکانس های تکراری پشت سر هم هستند که در سراسر ژنوم آنها پراکنده است و از لحاظ تعدادی با هم متفاوت می باشند در نتیجه از این تعداد تکرارهای متفاوت به عنوان وجه تفریقی می توان استفاده کرد(۱۴و۱۳).در E.coli سکانس های تکراری متعددی وجود دارد که بسیاری از آن ها در گوناگونی سوش ها دخیل هستند(۱۵).کلستریدیوم دیفیسیل و گونه های سالمونلا نیز دارای توالی های VNTR می باشند(۱۶).در ژنوم انگل ها و ویروس ها هم این توالی ها مشخص شده این در صورتی است که در قارچ ها هنوز این توالی دیده نشده است(۱۹-۱۷). ثبات قدمی این سیستم بیشتر از PFGE وAFLP می باشد(۱۰و۸). باکتری لپتوسپیرا در مقایسه با سایر باکتری ها دارای واحدهای تکرار با ارقام بالایی می باشد.۱۳۱ لکوس VNTR (طول هر واحد تکرار بین 5 تا 500bp)، در دو کروموزوم لپتوسپیرا پخش شده است. در بین لکوس های متعدد لکوس VNTR30 و VNTR36 که توانایی تفرق خوبی را در مطالعات گذشته برای تفکیک سروارهای L.introgans از خود نشان داده بودند انتخاب گردیدند. نتایج حاکی بر آن بود که سرووارساپروفیت PatocIاین دو لکوس را در ژنوم خود ندارد. مشابه نتایج به دست آمده از کار Slack(۲۰و۱۵). در نتیجه از این دو لکوس می توان برای تفرق سروارهای بیماری زا از غیر بیماری زا استفاده کرد. ضمن این که می توان استنباط کرد شاید این دو لکوس در بیماری زای دخیل باشند. لکوس VNTR30 در سروارهای Atumnalis و Hardjo St.Hardjo bovisو Pomona St. UT364 و Icterohaemorrhagia St. IGA و لکوس VNTR36 در سروارهای Canicola St. Hondutrecht IV و Hardjo St.Hardjo bovisو Pomona St. UT364 پلی مورفیسم قابل توجهی را نشان داده اند. سایر سروارها الگوی ژنوتیپی یک سانی را برای این ۲ لکوس نشان می دهند. مطالعات پیشین ثابت کرده بود سروارهای متفاوت بومی یک منطقه الگوهای ژنوتیپی یک سان بیش تری را نسبت به سروارهای یک سان مناطق دیگر از خود نشان می دهند(۲۱و۲۰و۱۵). یافته های این تحقیق صحه ای بر مطالعات پیشین می باشد زیرا اکثر سروارهای مختلف دارای الگوهای VNTR یک سان بودند این در حالی است که با سایر سروارهای یک سان آمریکای جنوبی و اروپا تفاوت های بارزی را از نظر الگوی VNTR نشان داده اند. ماجد در سال۲۰۰۵ عنوان کرد ایزوله های مناطق جغرافیایی مشخص در یک گروه هستند و الگوهای ژنتیکی مشترک زیادی نشان می دهند(۲۱). این در حالی است که سروارهای ما با سروارهای آسیای شرقی قرابت و نزدیکی بسیاری در الگوی VNTR داشتند و در واقع صحه ای بر حرف ماجد گذاشته شد. نکته قابل ذکر دیگر آن بود که بین L.introgans serovar canicola St. Hondutrecht IV و L.introgans serovar canicola St. Fiocruz LV133 توسط سیستم PFGE هتروژنسیتی مشاهده نشد اما ما توانستیم توسط تکنیک MLVA تفاوت ها را پیدا کنیم و این دو استرین را از هم تمایز دهیم. مشابه این یافته Salaum در سال ۲۰۰۶هترو ژنوسیتی را بین سروارهای یک سان شرح داد که قبلا با Pulse filed gel electrophoresis شناسایی نشده بودند و عنوان کرد MLVA توانایی ژنوتایپینگ و شناسایی سروارهای یک سان را دارد(۲۳). به علاوه ما در سروارهای یک سان دیگر Hardjo bovis، Hardjo St، Hradjo St. و Hardjo prajitno و Pomona St. UT364، Pomona St. وPomona RGA و Icterohaemorrhagiae St. Verdum، Icterohaemorrhagiae St. هم توانستیم پلی مورفیسم و هتروژنسیتی را بیابیم. این خود یافته بسیار بزرگی است که دال بر این قضیه است که می توان توسط این تکنیک سروارهای یک سان را از هم شناسایی کرد حتی سروارهایی که توسط سایر تکنیک ها مثل PFGE از هم شناسایی نمی شوند.

در تحقیق Majedو Slackو Salaumو Zurner ازاین تکنیک در بررسی های اپیدمیولوژیکی لپتوسپیراا استفاده گردیده است و نتایج ارزنده ای به دست آمده است(۱۵ و ۲۲-۲۰). با توجه به مطالعه حاضر و به دست آمدن پلی مورفیسم و هتروژنسیتی بین سرووارهای کار شده انتظار می رود از این تکنیک به راحتی بتوان در بررسی های اپیدمیولوژیکی –ملکولی لپتوسپیرا بر روی سرووارهای داخل کشور عزیزمان ایران استفاده کرد و نتایج قابل تعمقی را به دست آورد.

نتیجه گیری

الگوی MLVA گوناگونی ژنتیکی و ارتباط بین استرین ها را نشان می دهد . متد MLVA توانایی ژنوتایپینگ سرووارهای یک سان رادارد. و از طریق الگوی ژنتیکی آن ها را از هم تفکیک و شناسایی می شوند. سرووارهای یک منطقه الگوهای مشترک بیش تری را نسبت به الگوی سایر سرووارهای دنیا نشان می دهند. این متد بسیار دقیق، سریع و راحت است و می تواند در بررسی های اپیدمیولوژیک به کار برده شود.

REFERENCES

1- Ball, H. A.: Leptospiral jaundice. A report of two cases ،Amer J Clin-Path 3(1): 283-290

2-Paul ,N And Levett ,P. Two Methods For Rapid Serological Diagnosis Of Acute Leptospirosis, Clinical And Diagnosistic Laboratory Immounology, ,2001,8(2) 8340-351.

3- Levett .P.Leptospirosis .Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(1):296-326.

4- Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al: Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. Nature 2003; 422(5):888-893.

5- Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, et al: Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, J Infect Dis 1998; 178(1):1457-1463.

6- World Health Organization: Leptospirosis worldwide, Wkly Epidemiol Rec 1999; 74(1):237-242

7-Corney BG, Colley J, Graham GC, Simplified analysis of pathogenic leptospiral serovars by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. J Med Microbiol 1997, 46(4): 927-932

8- Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I, Pulse -filed gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA, a new rapid method of serovar identification.J Clin Microbiol 1992, 30(7):1696-1702

9-Roy S, Biswas D, Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC, A 22-mer primer enhances discriminatory power of AP-PCR finger printing technique in characterization of leptospires. Trop Med Int Health 2004, 9(8): 1203-1209

10-Vijayachari P, Ahmed N, Sugunan AP, Ghousunnissa S, Rao KR, Hasnain SE, Sehgal SC, Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. J Clin Microbiol 2004-42(1):3575-3580

11- Ramiss V, Houssu P, Hernandez E, Denoeud F, Hilaire V, Lisanti O, Ramiss F, Cavallo JD, Vergnaud G, Variable Number of Tandem Repeats in Salmonella enterica subsp. Enteric for Typing Purposes. J. Clin Microbiol2004, 42(6):5722-5730

12-Spurgiesz RS,Quitugua TN, Smith KL et al. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis by using nine novel variable number tandem repeats across the Beijing family and low copy number IS6110 isolates. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 4224-4230

13-Harris NB, Payeur JB, Kapur V and Sreevatsan S, Short sequence repeat analysis of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. Avium isolates collected from animals throughout the United States reveals both stability of loci and extensive diversity. J Clin Microbiol, 2006, 44(9): 2970-2973.

14-Park S F,Purday D and Leach S. Localized reversible frameshift mutation in the flhA gene confers phase variability to flagellin expression in Campylobacter coli. J Bacteriol 2000, 182(9):207-210

15-Slack, Andrew, Dohnt, Symons, Smythe, Development of a Multiple-locus Variable number of tandem repeat Analysis(MLVA) for Leptospira interrogans and its application to Leptospira interrogans serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia, Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials 2005,4:10

16-Gur-Arie R,Cohen CJ, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM and Kashi Y Simple sequence repeats in Escherichia coli: abundance, distribution, composition and polymorphism. Geenome Res, 2000, 10(7):62-71

17- Wickstead B, Ersfeld K and Gull K, Repetitive elements in genomes of parasitic porotozoa. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(3): 360-375

18-Xue SA,Jones MD, Lu QL, Middeldrop JM and Griffin BE,Genetic diversity : frame shift mechanisms alter coding of a gene(Epstein – Barr virus LF3 gene) that containing multiple 102-base- pair direct sequence repeats. Mol Cell Biol, 2003, 23(1): 2192-2201

19-Lott TJ, Holloway BP, Logan DA, Funyga R and Arnold J, towards understanding the evolution of the human commensal yeast Candida albicans. Microbiology, 1999, 145(2):1137-1143.

20- Slack, Andrew., Symonds, Meegan., Dohnt , Michael ., Smythe, Lee., An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for Leptospira interrogans serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis Gand its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia, Journal of Medical Microbiology,2006,55(3), 1549-1557

21- Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G., Picardeau, M., Identification ofvariable-numbertandem-repeatlociin Leptospira interrogans sensu strict, JClinMicrobiol2005, 43(10), 539–545

22- Zuerner, Richard L., Alt, David P., Variable Nucleotide Tandem-Repeat Analysis Revealing a Unique, Group of Leptospira interrogans Serovar Pomona Isolates associated with California,sea lions, Journal of of Clinical Microbiology, Apr.2009,5(2).1202-1205

23- Salaum, Laurence., merien, Fabric., Gurianova, Svetlana., Baranton, Guy., Picardeau, Application of multilocus variable number-tandem repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis, Journal of Clinical Microbiology, 200611(3),3954-3962