

问号钩端螺旋体属特异性 LipL41s 抗原膜定位及其患者血清抗体检测

胡野 郭宗琪 孙百莉 杨平 严杰

【摘要】 目的 确定问号钩端螺旋体(钩体)属特异性脂蛋白抗原 LipL41s 膜定位及其自然抗体应答情况和抗体类型。方法 采用显微镜凝集试验(MAT)检测四川地区钩体病患者血清标本。IPTG 诱导重组原核系统表达目的蛋白 rLipL41/1 和 rLipL41/2, Ni-NTA 亲和层析法提纯目的重组表达产物。采用 Western blot 检测感染不同血清群问号钩体病患者血清与 rLipL41s 的免疫反应性。采用胶体金免疫电镜技术,对 LipL41s 进行膜定位。建立基于 rLipL41s 的 ELISA,检测钩体病患者血清中特异性抗体水平及其类型。结果 黄疸出血群是四川地区最主要的优势钩体血清群。不同血清群问号钩体病患者血清均能有效识别 LipL41s。LipL41s 是位于钩体外膜表面的蛋白分子。156 例 MAT 阳性钩体病患者血清标本中,rLipL41/1 和 rLipL41/2 特异性 IgM 阳性率分别为 84.6%~87.8% 和 78.2%~83.3%,特异性 IgG 阳性率分别为 69.2%~81.4% 和 75.0%~80.1%。结论 LipL41s 是钩体表面蛋白抗原。自然感染钩体时,LipL41/1 和 LipL41/2 可诱导机体产生 IgM 和 IgG 两类血清抗体,且两者之间有广泛的抗原交叉反应。rLipL41/1 和 rLipL41/2 可作为研制通用型钩体基因工程疫苗和检测试剂盒的候选抗原。

【关键词】 钩端螺旋体; 基因,LipL41s; 重组表达; 抗原定位; 免疫应答

Study on the location of membrane and detection of antibody in the sera of genus-specific antigen LipL41s in patients with *Leptospira interrogans* HU Ye*, GUO Zong-qi, SUN Bai-li, YANG Ping, YAN Jie. *Medical School of Jinhua Professional Technique College, Jinhua 321000, China
Corresponding author: YAN Jie, Email: Med_bp@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the location on outer envelope and natural antibody response and types of genus-specific lipoprotein antigen LipL41s in patients with *Leptospira interrogans*. **Methods** Microscope agglutination test (MAT) was used to examine leptospirosis patients' serum samples from Sichuan area, China. Ni-NTA affinity chromatography was performed to extract the target recombinant rLipL41/1 and rLipL41/2 products that expressed under induction of IPTG. Western blot assay was performed to detect the immunoreactivity between the sera from the patients infected with different serogroups of *L. interrogans* and rLipL41s. Immune aerosol electron microscopy was selected to locate the position of LipL41s on leptospiral envelope. ELISA based on rLipL41s was established to confirm the level and types of specific antibody. **Results** *L. interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae remained to be the most dominant leptospiral serogroup in Sichuan area. All the sera from patients infected with different serogroups of *L. interrogans* could efficiently recognize the LipL41s which were the protein molecular that located on the external surface of leptospiral envelope. In the 156 serum samples from MAT positive leptospirosis patients, the positive rates for rLipL41/1 or rLipL41/2 specific IgM appeared to be 84.6%-87.8% and 78.2%-83.3%, respectively, while for rLipL41/1 or rLipL41/2 specific IgG they were 69.2%-81.4% and 75.0%-80.1%, respectively. **Conclusion** LipL41s were the leptospiral superficial protein antigen of *L. interrogans*. Both the LipL41/1 and LipL41/2 could induce serum antibodies IgM and IgG with extensive antigenic-cross reaction during natural infection of *L. interrogans* in general populations. Hence, rLipL41/1 or rLipL41/2 could be used as the antigen candidate for developing universal genetic engineering vaccine and detection kit.

【Key words】 *Leptospira interrogans*; LipL41s genes; Recombinant expression; Antigen location; Immune response

基金项目:浙江省科技厅国际合作重点资助项目(2006C24003)

作者单位:321000 浙江金华职业技术学院医学院(胡野);四川省疾病预防控制中心(郭宗琪);沈阳农业大学土地与环境学院(孙百莉);浙江大学医学院电镜室(杨平),病原生物教研室(严杰)

通讯作者:严杰, Email: Med_bp@zju.edu.cn

钩端螺旋体(钩体)病是全世界范围内流行的人兽共患病^[1-3],也是洪涝时重点监控的传染病之一^[4-6]。钩体血清群、型众多,各群、型间交叉保护作用微弱或无^[7-9]。目前均采用当地流行的钩体血清群、型制备多价全菌死疫苗,但该疫苗对其未包含的钩体血清群、型感染保护作用有限,易引起钩体病的爆发性流行^[7]。寻找钩体属特异性保护抗原,对于研制通用型钩体疫苗及实验室诊断试剂盒均有重要价值。Shang 等^[10]首先从流感伤寒群问号钩体基因组 DNA 中克隆了全长 1068 bp、编码 355 氨基酸的 LipL41 基因,并认为其表达的脂蛋白可能存在于所有致病性钩体的表面。我们在以往的实验中证实我国主要流行的钩体血清群 LipL41 基因分为 2 个基因型^[11],其重组原核表达系统均能有效表达目的重组蛋白。Western blot 结果证实 rLipL41/1 和 rLipL41/2 均能有效诱导家兔产生 LipL41 抗体^[12],但其抗原存在部位及其在自然感染人群中的抗体反应和类型迄今未见国内外研究报道。为此,我们建立了基于 rLipL41s 的 ELISAs 检测了钩体病患者血清中特异性 IgG 和 IgM,同时采用免疫电镜技术对 LipL41s 进行了膜定位,以期为研制钩体属特异性疫苗奠定基础。

材料与方 法

1. 菌株来源及培养:我国 15 群 15 型问号钩体参考标准株黄疸出血群赖型 56601 株、爪哇群爪哇型 56602 株、犬群犬型 56603 株、拜伦群拜伦型 56604 株、致热群致热型 56605 株、秋季群秋季型 56606 株、澳洲群澳洲型 56607 株、波摩那群波摩那型 56608 株、流感伤寒群临型 56609 株、七日热群七日热型 56610 株、巴达维亚群巴叶赞型 56612 株、塔拉索夫群塔拉索夫型 56613 株、曼耗群曼耗 II 型 56615 株、赛罗群乌尔夫型 56635 株、明尼群明尼型 56655 株均购自中国药品生物制品检定所,培养基为 EMJH 培养基。培养物以暗视野显微镜检查,若菌体形态典型、运动活泼、菌数 ≥ 200 条/400 \times 视野者可供使用。

2. 目的重组蛋白的表达: *pET32a-LipL41/1-E. coli BL21DE3* 和 *pET32a-LipL41/2-E. coli BL21DE3* 原核表达系统由本实验室提供^[11]。以 0.5 mmol/L IPTG、37 $^{\circ}$ C 诱导表达重组蛋白 rLipL41/1 和 rLipL41/2。采用 Ni-NTA(BioColor)亲和层析法提纯目的重组蛋白,以 10% 分离胶的

SDS-PAGE 和 BioRad 凝胶图像分析系统检查目的重组蛋白表达和提纯效果。

3. 目的重组蛋白抗血清的制备及其效价测定: 1 mg 的 rLipL41/1 或 rLipL41/2 与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化后背部皮下多点注射免疫家兔,间隔一周免疫 1 次,共 4 次。末次免疫 10 d 后采集心血,分离血清,以 rLipL41/1 或 rLipL41/2 为抗原,采用免疫双扩散法测定抗血清效价。

4. 钩体患者血清标本来源及其 MAT 检测: 发病后 1-4 周钩体病患者血清标本由四川省疾病预防控制中心提供,将患者血清用生理盐水对倍稀释,各取 0.1 ml 分别与 0.1 ml 上述我国 15 群 15 型 15 株致病性问号钩体新鲜培养物混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,用暗视野显微镜(400 \times)观察交叉凝集情况,实验中以生理盐水作空白对照,以 50% 钩体被凝集的血清最高稀释度为该血清 MAT 效价判断的终点^[13]。

5. Western blot: 以 1:500 稀释的 3 份黄疸出血群以及各 1 份秋季、澳洲、波摩那、流感伤寒和七日热群阳性患者血清为一抗,1:3000 稀释的羊抗人 IgG (Jackson Immuno Research) 为二抗,采用 Western blot 检测上述患者血清识别 rLipL41/1 或 rLipL41/2 的情况。

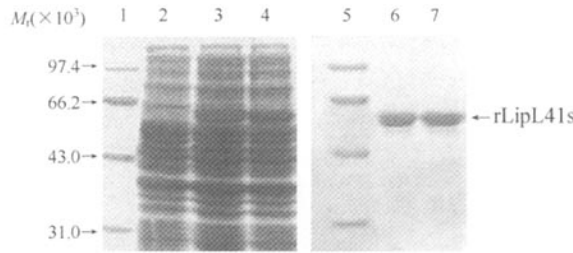
6. LipL41/1 的定位: 采用免疫电镜法。钩体 56601 株和 56604 株新鲜培养物 10 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 PBS 重悬洗涤并离心 2 次。第 2 次离心后沉淀中加入 20 倍体积的 2% 多聚甲醛液,4 $^{\circ}$ C 固定 24 h,按上法用 PBS 洗涤 2 次,明胶包埋后冰冻超薄切片。用 0.5 mmol/L NH_4Cl -0.1 mol/L PBS(pH 值 7.4)孵育 15 min,以封闭切片中游离醛基,PBS 漂洗 3 次后用 1% BSA-0.1 mol/L PBS(pH 值 7.4)室温封闭 30 min。以 1:1000 稀释的 rLipL41/1 或 rLipL41/2 兔抗血清为一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 反复漂洗后,加入 1:20 稀释的胶体金(12 nm)标记羊抗兔 IgG 为二抗,4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBS 反复漂洗后分别用中性醋酸双氧铀和酸性醋酸双氧铀溶液各染色 10 min,PBS 漂洗、风干后透射电镜观察。

7. rLipL41s-IgG/IgM-ELISAs: 酶标板每孔加入 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 rLipL41/1 或 rLipL41/2 溶液 0.1 ml,4 $^{\circ}$ C 包被 18 h。次日按常规封闭、PBS-Tween 20 洗涤,分别以 1:50 和 1:100 或 1:100 和 1:200 稀释的患者血清为一抗用于 IgM 或 IgG 检测,以 HRP 标记的 1:3000 稀释的羊抗人 IgM (Jackson Immuno Research) 或 1:4000 稀释的羊抗人 IgG 为二抗、OPD

为底物,显色后酶标仪(BioRad Model 680 型)检测其 A_{490} 值。实验中采用相同稀释度的 16 份 MAT 阴性的健康体检者血清作为阴性对照。以被检标本 A_{490} 值 \geq 阴性对照 A_{490} 均值 + 3 s 者为阳性^[14]。采用 χ^2 检验对各检测阳性率进行比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 目的重组蛋白的表达及提纯: SDS-PAGE 和凝胶图像分析系统分析结果显示, 所构建的 LipL41/1 和 LipL41/2 原核表达系统在 IPTG 诱导下能表达目的重组蛋白 rLipL41/1 和 rLipL41/2, 其表达量分别约占细菌总蛋白的 20% 和 15%, Ni-NTA 亲和层析法提纯后均仅见单一的蛋白条带(图 1)。



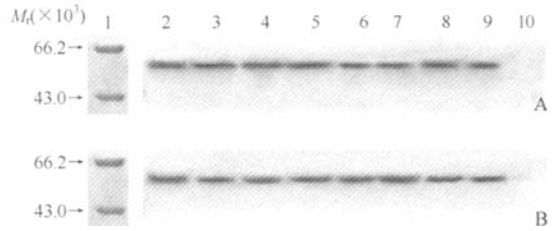
注: 1、5: Markers; 2: 无插入片段的 pET32a 质粒; 3、4: 表达的 rLipL41/1 和 rLipL41/2; 6、7: 提纯的 rLipL41/1 和 rLipL41/2

图1 rLipL41/1 和 rLipL41/2 表达及其提纯效果

2. 钩体患者血清 MAT 检测: 共有 156 份血清 MAT 效价 $\geq 1:80$ (表 1), 感染的钩体血清群为黄疸出血、秋季、澳洲、波摩那、流感伤寒和七日热群, 其中 2004 年凉山州血清标本 71 份、2005 年峨眉山市血清标本 51 份、2005 年名山市血清标本 34 份, 75% (117/156) 患者感染黄疸出血群钩体, 其余 25% (39/156) 患者分别感染秋季群、澳洲群、波摩那

群、流感伤寒群和七日热群钩体。

3. Western blot: 感染不同血清群问号钩体的患者血清均能与 rLipL41/1 或 rLipL41/2 发生免疫结合反应(图 2)。

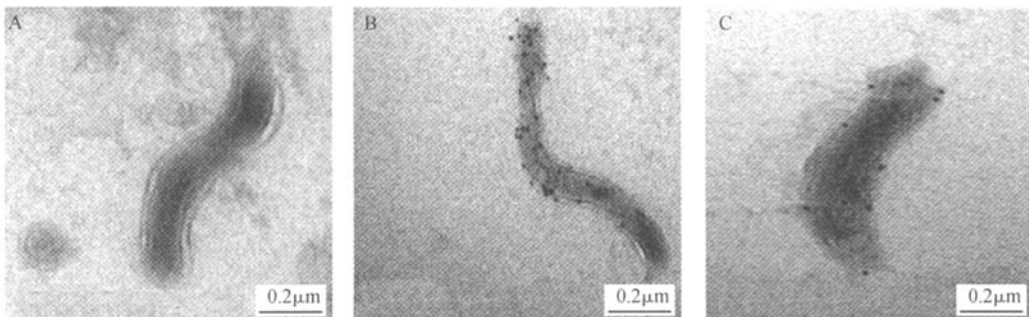


注: A1、B1: Markers; A2~A9、B2~B9: rLipL41/1 和 rLipL41/2 分别与 3 份黄疸出血群以及各 1 份秋季、澳洲、波摩那、流感伤寒和七日热群阳性患者血清的 Western blot 结果; A10、B10: 空白对照

图2 感染不同血清群问号钩体的患者血清与 LipL41s 的 Western blot 结果

4. 抗血清免疫效价测定及 LipL41s 的定位: rLipL41/1 和 rLipL41/2 兔抗血清免疫双扩散试验效价均为 1:4。免疫电镜观察结果显示, 免疫胶体金颗粒均定位于钩体 56601 株和 56604 株菌体表面(图 3)。

5. rLipL41s-IgG/IgM-ELISA 检测: 结果见表 2 和表 3。rLipL41/1-IgG-ELISA 中, 1:100 或 1:200 稀释的阴性对照血清标本 A_{490} 均值 ($\bar{x} \pm s$) 分别为 0.31 ± 0.04 或 0.24 ± 0.04 , 故其阳性判断标准值分别为 0.43 和 0.36; rLipL41/2-IgG-ELISA 中, 1:100 或 1:200 稀释的阴性对照血清标本 A_{490} 均值 ($\bar{x} \pm s$) 分别为 0.29 ± 0.08 或 0.20 ± 0.05 , 故阳性判断标准值分别为 0.53 和 0.35。根据上述判断标准值, 1:100 或 1:200 稀释的血清标本 rLipL41/1-IgG-ELISA 阳性率分别为 81.4% (127/156) 和 69.2% (108/156), 1:100 或 1:200 稀释的血清标本 rLipL41/2-IgG-ELISA 阳性率分别为 80.1% (125/156) 和 75.0%



注: A: 阴性对照; B: 结合于问号钩体 56601 株表面 LipL41/1 的免疫胶体金颗粒; C: 结合于问号钩体 56604 株表面 LipL41/2 的免疫胶体金颗粒

图3 LipL41s 定位的免疫电镜观察结果

表1 四川省 156 例钩体病患者血清标本 MAT 检测结果

地区	病例数	血清群	MAT 效价 (1:)							病例数合计
			80	160	320	640	1280	2560	5120	
凉山州	71	黄疸出血	13	4	8	3	6	4	1	39
		秋季	0	3	0	1	1	0	0	5
		流感伤寒	1	4	0	2	1	0	0	8
		澳洲	2	3	1	1	0	0	0	7
		七日热	4	0	2	1	0	0	0	7
		波摩那	1	0	2	2	0	0	0	5
峨眉山市	51	黄疸出血	3	4	11	7	9	13	4	51
		波摩那	1	0	2	2	0	0	0	5
名山市	34	黄疸出血	3	7	2	8	5	2	0	27
		澳洲	1	1	1	2	1	0	0	6
		波摩那	0	0	0	0	1	0	0	1
合计	156		28	26	27	27	24	19	5	156

表2 四川省 156 例钩体病患者血清标本 rLipL41/1 和 rLipL41/2-IgG-ELISA 检测结果

血清群	病例数	rLipL41/1				rLipL41/2			
		IgG-ELISA(1:100)		IgG-ELISA(1:200)		IgG-ELISA(1:100)		IgG-ELISA(1:200)	
		阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)	阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)	阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)	阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)
黄疸出血群	117	93	0.36~2.32(1.12±0.43)	77	0.16~1.71(0.76±0.33)	89	0.27~1.84(0.99±0.33)	87	0.15~1.54(0.71±0.30)
澳洲	13	11	0.75~1.57(1.15±0.32)	11	0.49~1.20(0.76±0.22)	11	0.72~1.40(1.08±0.25)	11	0.36~1.20(0.78±0.24)
流感伤寒	8	8	0.98~2.87(1.52±0.69)	8	0.74~2.09(1.15±0.48)	8	0.89~1.26(1.05±0.13)	7	0.41~1.23(0.76±0.26)
七日热	7	6	1.08~1.56(1.20±0.55)	5	0.52~1.21(0.91±0.25)	7	0.66~1.66(1.16±0.34)	6	0.54~1.07(0.86±0.19)
波摩那	6	4	0.71~1.96(1.18±0.55)	3	0.44~1.39(0.79±0.43)	6	0.84~1.32(1.00±0.17)	3	0.45~1.03(0.68±0.26)
秋季	5	5	1.06~1.61(1.22±0.23)	4	0.54~1.08(0.74±0.21)	4	0.64~1.39(1.06±0.34)	3	0.30~1.07(0.81±0.40)
合计	156	127	0.36~2.32(1.21±0.53)	108	0.16~2.09(0.78±0.34)	125	0.27~1.84(1.01±0.31)	117	0.15~1.54(0.73±0.29)

表3 四川省 156 例钩体病患者血清标本 rLipL41/1 和 rLipL41/2-IgM-ELISA 检测结果

血清群	病例数	rLipL41/1				rLipL41/2			
		IgM-ELISA(1:50)		IgM-ELISA(1:100)		IgM-ELISA(1:50)		IgM-ELISA(1:100)	
		阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)	阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)	阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)	阳性例数	A ₄₉₀ 值 (x̄ ± s)
黄疸出血群	117	101	0.17~1.68(0.80±0.35)	99	0.07~1.37(0.56±0.28)	95	0.21~2.83(1.35±0.44)	90	0.07~2.08(1.05±0.40)
澳洲	13	13	0.54~1.64(0.96±0.29)	13	0.38~1.15(0.67±0.21)	11	0.96~1.72(1.35±0.23)	10	0.67~1.37(0.98±0.24)
流感伤寒	8	7	0.42~1.16(0.89±0.26)	7	0.28~0.81(0.60±0.19)	8	1.17~1.83(1.54±0.26)	8	0.82~1.47(1.19±0.25)
七日热	7	5	0.39~1.01(0.74±0.26)	4	0.24~0.82(0.52±0.23)	6	0.66~1.73(1.19±0.39)	5	0.35~1.52(0.89±0.37)
波摩那	6	6	0.47~1.02(0.68±0.23)	5	0.30~0.70(0.46±0.16)	5	0.96~1.79(1.32±0.31)	4	0.69~1.46(1.03±0.34)
秋季	5	5	0.47~1.24(0.78±0.26)	4	0.30~0.84(0.52±0.21)	5	1.22~1.64(1.42±0.17)	5	0.77~1.22(0.97±0.16)
合计	156	137	0.17~1.68(0.81±0.34)	132	0.07~1.37(0.56±0.27)	130	0.21~2.83(1.35±0.40)	122	0.07~2.08(1.05±0.37)

(117/156)。rLipL41/1-IgM-ELISA 中,1:50 或 1:100 稀释的阴性对照血清标本 A₄₉₀ 均值 (x̄ ± s) 分别为 0.33 ± 0.05 或 0.25 ± 0.05, 故阳性判断标准值分别为 0.48 和 0.40; rOmpL1/2-IgM-ELISA 中,1:50 或 1:100 稀释的阴性对照血清标本 A₄₉₀ 均值 (x̄ ± s) 分别为 0.28 ± 0.06 或 0.19 ± 0.03, 故阳性判断标准值分别为 0.46 和 0.28。根据上述判断标准值,1:50 或 1:100 稀释的血清标本 rLipL41/1-IgM-ELISA 阳性率分别为 87.8% (137/156) 和 84.6% (132/156), 1:50 或 1:100 稀释的血清标本 rLipL41/2-IgM-ELISA 阳性率分别为 83.3% (130/156) 和 78.2% (122/156)。χ² 检验结果表明,除 1:100 稀释的血清标本 rLipL41/1-IgG-ELISA 阳性率高于 1:200 稀释的血清标本外 (P < 0.05), 其余同一抗体不同稀释

度血清检测阳性率之间差异均无统计学意义 (P > 0.05)。

讨 论

致病性问号钩体因其血清群、型众多且有地区分布差异,故不同地区必须采用不同组合的多价疫苗进行免疫接种,血清学检测方法及其过程也相当繁琐和复杂。钩体属特异性抗原 (GP-Ag) 是指不同钩体血清群、型均具有的抗原^[7,13],因而在研制通用型钩体疫苗及检测试剂盒中有重要应用价值和现实意义。采用目前成熟的基因工程技术,可较为便利地获得大量目的蛋白,故钩体属特异性外膜蛋白抗原更受到人们重视。

迄今全球分离并获得鉴定的问号钩体已有 24

个血清群 259 个血清型,我国则有 18 群 75 型,且新的血清群、型仍在不断发现之中^[7]。尽管我国问号钩体血清群众多,但黄疸出血群、流感伤寒群、秋季群和波摩那群是我国最为流行的钩体血清群,其次是七日热群和澳洲群,近年引起我国南方地区钩体病暴发的棉兰型钩体,早年也归属于七日热群^[13]。本研究中 MAT 检测结果也证实,四川地区 156 例钩体病患者感染的钩体血清群也分别是黄疸出血群、流感伤寒群、秋季群、波摩那群、七日热群和澳洲群。

上述 MAT 结果还表明,黄疸出血群是四川省峨眉山市和名山市主要流行的钩体血清群(100%和 79.4%),该省凉山州流行的钩体血清群较为复杂,虽以黄疸出血群多见(54.9%),但感染问号钩体澳洲群、流感伤寒群、秋季群、七日热群和波摩那群也占 45.1%。由于有 75%(117/156)上述患者感染黄疸出血群钩体,因此黄疸出血群钩体仍然是四川地区最主要的优势钩体血清群。

MAT 是暗视野显微镜下观察的活钩体与其抗体的免疫凝集试验^[7,13]。我们以往证实的 rLipL41s 抗血清与我国 15 群 15 型钩体参考标准株均可呈阳性的 MAT 结果^[11]。本研究中,感染不同血清群问号钩体的患者血清均能识别 rLipL41/1 或 rLipL41/2 并与之发生免疫结合反应。上述实验结果不仅提示 LipL41 是属特异性抗原,也提示该抗原极可能位于钩体表面。从 LipL41 基因序列和结构特点分析,其产物也应是膜蛋白,但无法确定是内膜或外膜及外膜内、外表面或穿膜蛋白。众所周知,必须是位于病原微生物表面的抗原,才能用于研制疫苗或检测试剂盒,故确认 LipL41s 是否位于钩体外膜表面仍有其必要性。免疫胶体金技术用于靶分子定位,较之酶免疫技术因无显色底物弥散现象而更为精确。我们以往的实验证实我国流行的 15 群 15 型问号钩体分为 2 个基因型,56601 和 56604 株钩体分别属于 LipL41/1 型和 LipL41/2 型^[11]。本研究中我们采用了免疫胶体金电镜技术,发现免疫胶体金颗粒均定位于钩体 56601 株和 56604 株菌体表面,提示 LipL41 是钩体外膜外表面或穿膜蛋白。

采用基因工程技术进行目的基因原核表达,基因携带载体和宿主菌分别改为质粒和大肠埃希菌,有可能因外部条件改变而引起蛋白分子空间构象变化。尽管原核细胞微生物蛋白的免疫原性主要取决于分子的一级结构,但存在空间构象变化导致免疫原性改

变的可能性。已知钩体抗感染免疫主要依赖抗体为主的体液免疫^[7,13]。为此,我们建立了基于 rLipL41/1 和 rLipL41/2 的 ELISA,以期了解在钩体自然感染人群后,机体有无对 LipL41 产生抗体应答及特异性抗体类型。实验结果表明,不同稀释度的 156 例钩体病患者血清标本中,rLipL41/1 和 rLipL41/2 特异性 IgM 阳性率分别为 84.6%~87.8% 和 78.2%~83.3%,特异性 IgG 阳性率分别为 69.2%~81.4% 和 75.0%~80.1%,提示自然感染钩体病患者可出现对 LipL41s 有效的体液免疫应答并产生 IgM 和 IgG 两类血清抗体,rLipL41/1 和 rLipL41/2 可作为通用型钩体基因工程疫苗的候选抗原。此外,MAT 特异性和敏感性虽较高但十分繁复,故本研究中建立的 rLipL41s-IgM/IgG-ELISA 若能进一步改进和完善,有可能成为简便、快速、通用的钩体病血清学检测方法,用于临床钩体病实验室诊断。

参 考 文 献

- [1] Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 296-326.
- [2] Meslin FX. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. Emerg Infect Dis, 1997, 3: 223-228.
- [3] Lomar AV, Diament D, Torres JR. Leptospirosis in Latin America. Infect Dis Clin North Am, 2000, 14: 23-39.
- [4] Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P. Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. Natl Med J India, 2002, 15: 22-23.
- [5] Barcellos C, Sabroza PC. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. Cad Saude Publica, 2001, 17: 59-67.
- [6] Fuortes L, Nettleman M. Leptospirosis: a consequence of the Iowa flood. Iowa Med, 1994, 84: 449-450.
- [7] Faine S, Adler B, Bolin C. *Leptospira* and Leptospirosis, Second edition, Australia, Melbourne: MedSci, 1999.
- [8] Sonrier C, Branger C, Michel V, et al. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine, 2000, 19: 86-94.
- [9] Guerreiro H, Croda J, Flannery B, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun, 2001, 69: 4958-4968.
- [10] Shang ES, Summers TA, Haake DA, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic leptospira species. Infect Immun, 1996, 64: 2322-2326.
- [11] 丁威, 严杰, 毛亚飞. 中国主要钩端螺旋体血清群 LipL41 基因型分析及其表达产物的交叉保护作用. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24: 859-865.
- [12] 孙百莉, 罗冬娇, 孙军德, 等. 钩端螺旋体主要属特异性蛋白抗原分布及其免疫性研究. 中华流行病学杂志, 2006, 27: 1073-1077.
- [13] 于恩庶. 钩端螺旋体病的发现及流行简史//严杰, 戴保民, 于恩庶. 钩端螺旋体病学. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [14] Lewis SM, Osei-Bimpong A. Haemoglobinometry in general practice. Clin Lab Haematol, 2003, 25: 343-346.

(收稿日期: 2007-01-19)

(本文编辑: 张林东)