

計畫編號：DOH95-DC-2039

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

建立鉤端螺旋體病分子診斷參考實驗室

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：邱詩惠

研究人員：王秀貞、林佳慧、江春雪

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目錄

目錄	頁次
中文摘要	3
英文摘要	4
前言	6
材料與方法	9
結果	13
討論	16
結論與建議	19
參考文獻	20
圖	21
表	27

摘要

關鍵詞：鉤端螺旋體、聚合酶鹼素連鎖反應、即時定量聚合酶鹼素連鎖反應

鉤端螺旋體病一直是全球熱帶與亞熱帶地區重要的人畜共通傳染病。其感染病程與感冒類似，或偶有嚴重型如出血、黃疸之發現。鉤端螺旋體病的實驗室標準診斷方法為分離培養，但是培養通常需要 8 周以上的時間，方能得知確定的結果。目前，WHO 亦認可以血清學反應的顯微凝集試驗作為鉤端螺旋體的”診斷標準”。但兩種標準診斷方法皆需要技術純熟之實驗操作人員，且因培養需時甚久或配對血清採集時間為 14 天以上，致實驗室診斷無法予病患提供及時的幫助。本計畫的主要目標在建立一套完整的鉤端螺旋體病快速分子檢驗系統，能在病人急性期全血中及早偵測病原。本實驗室成功應用一套以 SYBR Green I 螢光染劑的即時定量 PCR 檢驗系統，能快速檢測出病原性鉤端螺旋體核酸分子，其靈敏度可偵測每毫升血漿中 100 隻鉤端螺旋體，並可同時區分不同基因型別。未來，期待本研究的完成能對於嚴重型或黃疸型之鉤端螺旋體病患者，能做出快速而準確的評估，達到早期給予有效的治療。

Abstract

Keywords: *Leptospira*, PCR, real-time PCR

Leptospirosis is a major zoonotic disease throughout the world, especially in tropical and subtropical areas. Infection causes flu-like episodes, occasionally more severe forms such as haemorrhage and jaundice can occur. Traditionally laboratory diagnosis of leptospirosis has depended upon the isolation of *Leptospira* from clinical specimens, but it takes more than eight weeks to have definite results. Currently the microscopic agglutination test (MAT), designated by the World Health Organization as a reference method, is used to demonstrate seroconversion in paired acute and convalescent serum samples. Both of these methods require expertise not routinely available in clinical laboratories and usually result in delayed diagnosis. The purpose of this study was to establish and optimize a conventional and real-time PCR methodology for early detection pathogenic *Leptospira* in clinical specimens. Reactions were monitored by SYBR green fluorescence and melting curve analysis. Specific PCR products were obtained only with DNA of pathogenic *Leptospira* genomospecies. Using melting curve analysis is able to identify a single species or set of species. Assay sensitivity was approximately 100 leptospires/ml. These data illustrate the potential of real-time assay for the rapid detection of *Leptospira* in serum samples and their subsequent quantification in a

single run. This established methodology will benefit to patients with severe forms (Weil's disease or SPHS) of leptospirosis, the early detection will ensure the effective treatments.

前言

鉤端螺旋體病一直是全球熱帶與亞熱帶地區重要的人處共通傳染病，常於洪水氾濫後造成流行。過去鉤端螺旋體病經常受到忽略，國際上亦然。在民國 65 年台灣發表第一例鉤端螺旋體病疑似病例，直到二十年後才又有相關病例被發表。歸納其主要忽略原因為感染者臨床表癥差異大，從不顯性感染到致死性肝腎衰竭、呼吸器官或多重器官衰竭皆有可能發生；而且易與其他疾病如：感冒、上呼吸道感染、不明熱、無菌性腦膜炎、病毒性肝炎等混淆而誤診。另外，還須與漢他病毒感染、立克次體感染和登革熱、登革出血熱及瘧疾做鑑別診斷。由於初期症狀與感冒十分類似，所以常被誤診為其他感染症而延誤病情。像是巴西於 1996 年鉤端螺旋體病與登革熱同時發生流行期間，有 42 % 鉤端螺旋體病患者被誤診為登革熱。這幾年在國內醫師、學者及本局的宣導下，本病才逐漸獲得重視，臨床疑似病例數增加。

疾病管制局自 89 年起展開台灣鉤端螺旋體病監測偵察流行情形，依據近六年來的監測結果，報告檢體數為 189 件，90 年度 1137 件，91 年度 1266 件，92 年度 1076 件，93 年度 2707 件，94 年度累計到七月共有 1714 件，每年還是約有 101 例至 558 的血清陽性

件數發生。而台灣鉤端螺旋體病患者較長出現症狀依序為發燒、急性腎衰竭、肌無力與黃疸。患者之感染以血清型 *shermani* 為最多，感染此型比例每年維持在 80 % 上下，另外台灣也存在血清群 *tarassovi*、*australis*、*javanica* 等次要感染型別。

在鉤端螺旋體病之實驗室診斷方面，目前還是以血清學顯微凝集法為國際認定之“黃金準則”。在急性期（發病一周內）血清抗體尚未大量產生，必須輔以相隔十四天之配對血清變化情形，或是靠分離培養，或是以 PCR 檢驗輔助。然而執行顯微凝集法檢驗，需耗費大量人力、時間，且不易推行於一般實驗室。再者，鉤端螺旋體分離培養需至少培養 8 周以上，甚至超過 12 周才有，且檢驗更需要有經驗之檢驗人員進行檢查等難處，近年國際上紛紛發展出許多分子生物學診斷方法，以利快速檢驗。目前已開發出的檢驗標的基因，包括 16s rRNA 與鞭毛基因...等等。這些方法其檢驗的敏感度與特異度雖均受到肯定，然而面對臨床檢體時，各個實驗室評估結果仍有差異。對於接受全國送來的防疫檢體，開發更快速的檢驗方法與研擬研判標準，以服務病患達到治療與防治，一直是本局的目標。本計畫的目的在於建立完整的鉤端螺旋體病 SYBR Green I 螢光染劑及時定量分子診斷系統，能在疑似鉤端螺旋體病之黃疸等

重症患者全血檢體，快速且正確的檢驗出鉤端螺旋體核酸分子，應對患者的治療與疾病防治將有極大的助益。

材料與方法

鉤端螺旋體菌株

本實驗共使用20株鉤端螺旋體菌株。其中所使用的參考菌株17株，89年與90年間分別自人體檢體分離的台灣本土參考菌株2株，皆由潘銘正教授分讓；另於本年度自疾病管制局通報疑似鉤端螺旋體病病例之全血檢體分離1株新增臨床分離株。

血液檢體

血液檢體使用含EDTA抗凝劑之採血管採集。臨床血液檢體來自疾病管制局通報疑似鉤端螺旋體病病例之全血檢體。實驗室依據送驗檢體防疫資料，僅對於感染初期約10日內及未投藥前之檢體進行病原分離培養。取約0.1毫升血漿接種於EMJH培養基(Bacto Leptospira Medium Base EMJH, No.0794, Difco, Michigan, USA及Enrichment)並添加5-fluorouracil (100-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)以抑制雜菌生長，將接種後之培養基置於28-30 之培養箱中。每週1次以暗視野顯微鏡檢查，至少觀察8周，觀察是否分離出鉤端螺旋體。

核酸處理

以 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) 抽取及純化菌株或血

液檢體的細菌核酸。純化後的 DNA 則冰存於-20 待用。

核酸增幅偵測法

實驗共使用3組引子組（表一）進行，分別為：G1/G2 引子組針對病原性鉤端螺旋體增幅，產物大小為 285-bp。
flaB-typing 針對病原性鉤端螺旋體進行增幅，產物大小為 793-bp；增幅產物需以限制酵素Hind III與Hae III分別處理，比對其RFLP profile。Real-time PCR則採用 LFB1-F/ LFB1-R引子組針對病原性鉤端螺旋體血清型Lai的LA0322 locus所設計，可針對病原性鉤端螺旋體增幅，產物大小為331-bp。

在測試比較PCR與real-time PCR敏感性方面，使用已知濃度並序列稀釋之參考菌株同時進行血液檢體核酸回收與檢驗極限測試。測試結果另進行膠體電泳確認產物。

PCR反應試劑內含1X PCR緩衝溶液，0.25 mM dNTP，0.2 μM引子各一，1 U Taq與核酸檢體，總反應體積為50 μL。反應初始以94 變性反應5分鐘，再以94 1分鐘、55 1分鐘、72 2分鐘，進行35個循環，最後以72 做聚合延長反應5分鐘，最後降溫至4 。進行*flaB*-typing前需將所得產物純化，才進行限制酵素切割，以2.5 % GTG agarose電泳分析確認。

Real-time PCR反應以Fast Start DNA STBR Green I試劑套組 (Roche Diagnostics)進行，試劑內含dNTP mixed、STBR Green I 染劑、Fast Start Taq與 5 mM MgCl₂，再加入0.5 μ M 引子各一，最後加入核酸檢體，總反應體積為20 μ L。反應初始以94 變性反應5分鐘，再以94 1分鐘、55 1分鐘、72 2分鐘，進行35個循環，最後以72 做聚合延長反應5分鐘，最後降溫至4 。

MAT 檢驗

選用的抗原為 Aaustralis、Canicola、Pomona、Icterohaemorrhagiae、Lyme、Javanica、Bataviae及Shermani等8種血清群（共9個血清型）。隨機選取通報鉤端螺旋體病病例血清檢體先行血清型篩檢，篩檢方式如下：含PBS (phosphate buffered saline) 對照、陰性對照與陽性對照血清，各取0.025 mL分別與鉤端螺旋體血清型抗原，以等量體積反應。欲測試血清以PBS稀釋50倍，分別與20個鉤端螺旋體血清型抗原各0.025 mL，於微量培養盤各個小格中小反應。用保鮮膜蓋住培養盤，放入37 保溫箱中半小時，依序從小格中吸取0.003 mL，以暗視野顯微鏡觀察菌體凝集情形。以200倍判讀，在視野下50%菌

體凝集者判定為陽性。血清型力價判別：陽性血清型才需進行此項檢驗。將欲測力價之血清以PBS稀釋50倍，連續稀釋至6,400倍。添加等量陽性血清型抗原，反應後於暗視野顯微鏡下觀察，於50%菌體凝集之血清稀釋倍數即為該血清抗體力價。

結果

1. G1/G2、*flaB* 和 LFB1 引子對專一性測試結果：

隸屬於自營腐生性 *L. biflexa* 的 1 株參考菌株，無法以 G1/G2 和 *flaB* 引子增幅出任何產物，以 LFB1 引子無法增幅出特異性的 331-bp 產物。所有屬於致病性的參考菌株，共計 16 株，皆可以 G1/G2、*flaB* 和 LFB1 引子對增幅出產物。隸屬於 *L. inadai* 的 2 株參考株能增幅出 *flaB* 產物，但無法以 G1/G2 引子增幅，以 LFB1 引子無法增幅出特異性的 331-bp 產物（表二、表三）。

2. *flaB* typing 測試參考菌株方面：

利用 *flaB* gene Hind III 和 Hae III 的切割圖譜分析，*flaB* type 可分為：Ia、Ib、IIa、IIb、IIc、IIIa 和 IV 型。屬於 Ia 型的參考菌株有 Bratislava, Akiyami A, No 8 Vcop, Djasiman, Izena, Honda Utrecht IV, LT1026, CF1, Pomona, Van Tienen 和 Jez，全部屬於 *L. interrogans* 基因種。屬於 Ib 型的參考菌株為 Kremastos，屬於 *L. interrogans* 基因種。屬於 IIa 型的參考菌株為 3522C，屬於 *L. kirschneri* 基因種。屬於 IIb 型的參考菌株為 CZ214，屬於 *L. noguchii* 基因種。屬於 IIc 型的參考菌株為 ATCC43286，屬於 *L. santarosai* 基因種。屬於 IIIa 型的參考菌株為 Poi 屬於 *L.*

borgpetersenii 基因種。屬於 IV 型的參考菌株為 43289 屬於 *L. inadai* 基因種 (圖一、圖二、圖三、表一)。

3. real-time PCR 測試參考菌株方面：

以 LFB1 real-time PCR 測試參考菌株方面，除了參考菌株 43289 無法以 LFB1 引子增幅出 331-bp 產物外，可以根據特異性的 331-bp 增幅產物之 T_m 值，作為分子分型依據 (圖四)。此分型結果與 *flaB* typing 結果相符 (表三)。10 株參考菌株 Bratislava, Akiyami A, No 8 Vcop, Djasiman, Izena, Honda Utrecht IV, LT1026, CF1, Pomona, Van Tienen 和 Jez，屬於 *L. interrogans flaB* type Ia，平均 T_m 值為 83.788，最高值與最低值差異為 0.39。

4. 測試比較 PCR 與 real-time PCR 敏感度結果：

參考菌株 *L. interrogans* strain CF1 以血漿序列稀釋 (10^8 leptospire / mL - 10 leptospire / mL)，經回收純化分別進行 G1/G2、*flaB* PCR 反應及 LFB1 real-time PCR。結果顯示以 LFB1 最優，偵測極限達 100 leptospire / mL，其 T_m 值為 83.62 (圖五)；其次為 G1/G2 PCR，偵測極限達 10^4 leptospire / mL；最後為 *flaB* PCR，其偵測極限為 10^5 leptospire / mL。

5. 偵測疑似鉤端螺旋體病患者血液檢體方面：

針對 35 件疑似鉤端螺旋體病患者血液檢體，初步利用 G1/G2、*flaB* 進行偵測，其 1 件檢體 PCR 呈陽性，另 34 件檢體皆為陰性。此陽性檢體之菌株分離培養亦為陽性，隨後進行 *flaB* typing 更詳細的分析（表四）。限制酵素 Hind III 切割成 3 片段，大小分別約為 367、306、120-bp，限制酵素 Hae III 切割成 2 片段，大小分別約為 642、151-bp，與參考菌株比對後研判均屬於 *flaB*-type IIIa，屬於（表三）。以 LFB1 real-time PCR 所得的增幅產物大小均為 331-bp； T_m 值為 86.32，與參考株 *L. borgpetersenii* strain poi 最接近，僅差距 0.1（表三）。此臨床分離株由此初步結果顯示，為 *L. borgpetersenii* 的可能性最高。

討論

目前的鉤端螺旋體病實驗室診斷，主要還是以傳統的細菌分離培養，以及血清抗體 MAT 檢驗。在急性期的血清檢體，並非所有的嚴重型患者皆可產生足量且可被檢測的抗體，僅能依賴分離培養和與恢復期比較血清的抗體反應變化。而傳統 PCR 檢驗方法的檢測結果只能供參，主要是受限於檢驗的敏感性，其偵測極限僅有 10^4 leprospires /mL。研究指出當血中鉤端螺旋體濃度達 10^4 leprospires /mL 時，不良導致死亡。因此，我們建立了以 SYBR Green I 螢光染劑的 real-time PCR 檢驗方法，不僅可區分出致病性菌株與非致病性菌株外，且敏感度可達 10^2 leprospires /mL，具有投入檢驗臨床檢體的價值。

鉤端螺旋體分類方法目前是以血清學分類和基因種分類同時並行，然而血清學分類和基因種分類二者並不完全相符。屬於同一種的基因種，含括多種血清群，例如常引起重症的基因種 *L. interrogans*，可再區分為 Icterohaemorrhagiae、Canicola、Pomona、Australis、Autumanilis、Pyrogenes、Grippotyphosa、Djasiman、Hebdomadis、Sejroe、Bataviae、Ranarum、Louisiana、Mini 和 Sarmin 等血清群。因此，基因種鑑定無法提供足夠的流行

病學訊息;並且,根據研究基因種分布具地域性,如南美洲主以 *L. santarosai* 與 *L. noguchii* 基因種,亞洲主以 *L. alexanderi* 與 *L. weilii* 基因種。反觀病原性血清型通常具有專屬保菌儲主(reservoir)的特性,因此根據菌株血清學分類的結果,能夠提供可能的感染源等流行病學資訊。一般認為鼠類可能是台灣主要的感染散佈來源。

在台灣鼠類鉤端螺旋體抗體盛行率調查方面,於 2005 年 6 月至 2006 年 5 月間最新調查發現,血清群 Pomona 為主要感染血清型,這與過去的調查報告,主要以血清型 Shermani 為主的結果略有不同。台灣患者最常見的感染血清型亦是 Shermani,未來是否隨鼠類主要感染血清型更動改變,需持持續監測以了解其情況。自 89 年迄今,本局確認的 3 株人體鉤端螺旋體本土分離株,經血清型及 *flaB* typing 分析,各為 *L. inadai*, *L. santarosai* 和 *L. borgpetersenii* 基因種。病患皆來自台灣南部地區。由於本土人體與動物分離菌株不多,型別又不同,故難以歸納出台灣本土流行情形等。未來,積極調查台灣南部地區各種可能的貯菌動物攜帶與感染鉤端螺旋體狀況,釐清台灣鉤端螺旋體流行情形。

本研究利用 LFB1 引子,以 SYBR Green I 螢光染劑的即時定量

PCR 方法，不但敏感度高、操作方便簡單，且可同時區分不同基因型別，適合應用於臨床檢驗與貯菌動物流行病學調查。

結論與建議

由於台灣氣候高溫多雨，十分適合鼠媒的繁殖，拜全球化的趨勢與交通運輸之便，人畜共通傳染病在全球各地發生情形激增。需要類症鑑別の種類與檢驗件數急遽增加，建立一套快速而完整的檢驗系統不僅必要且十分急迫。雖然鉤端螺旋體病並非法定傳染病，但是由鉤端螺旋體感染造成的嚴重黃疸等重症等患者，致死率卻相當高。因此，除了建立以 real-time PCR 作為鉤端螺旋體快速診斷系統，可讓這類患者於患病早期給予治療，同時對於防治工作也是極為重要。

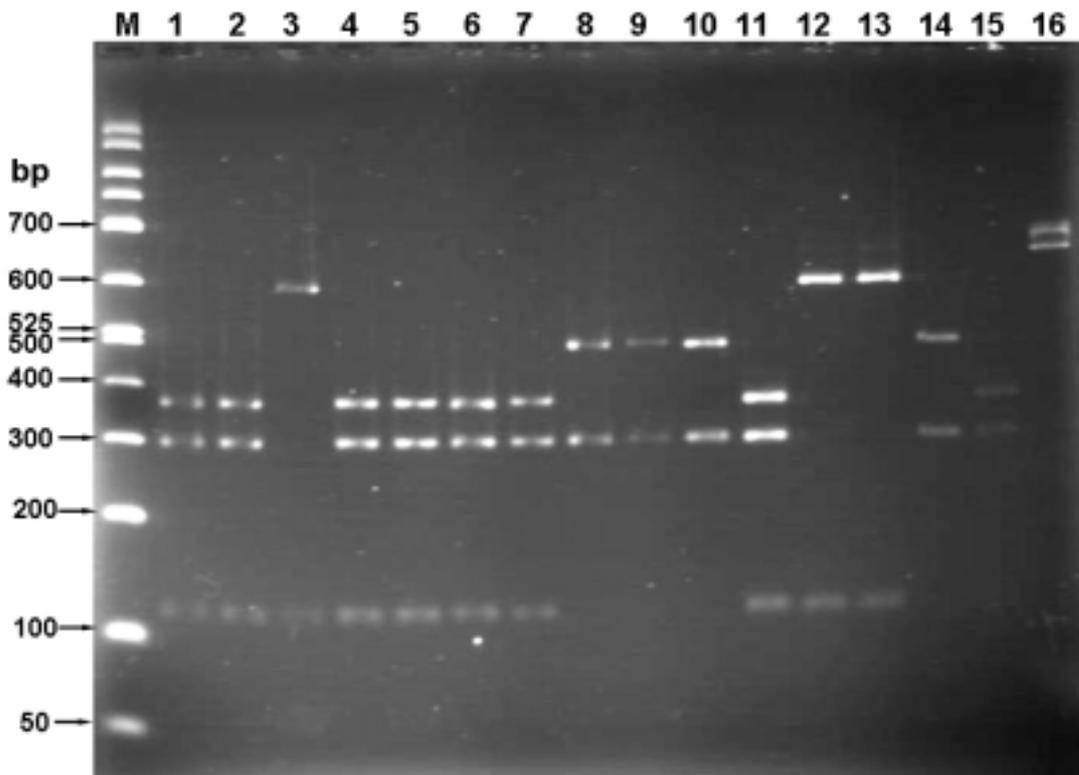
參考文獻

1. 楊杰穎, 2006。使用顯微凝集試驗、乳膠凝集試驗, 與 LipL32 重組蛋白質構成的酵素連結免疫吸附法調查臺灣地區鼠類的鉤端螺旋體抗體盛行率。國立臺灣大學獸醫學研究所碩士論文。
2. 潘銘正、楊智偉、李智隆。鉤端螺旋體病。疫情報導 1996; 12(12): 389~94.
3. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. 2003. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol. 41(2):803-9.
4. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infect Dis. 3:757-71
5. Covic A, Goldsmith DJ, Gusbeth-Tatomir P, Seica A, Covic M. 2003. A retrospective 5-year study in Moldova of acute renal failure due to leptospirosis: 58 cases and a review of the literature. Nephrol Dial Transplant. 18:1128-34.
6. Everard COR, Edwards CN, Everard J D, et al. 1995. A twelve- year study of leptospirosis on Barbados. Europ J. Epidemiol. 11:311-20.
7. Faine S. 1999. Leptospira and leptospirosis. 2nd ed., MediSci, Melbourne, Australia.
8. Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SYAM, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H. 2001. *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. Microbiol immunol. 45:491-496.
9. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection

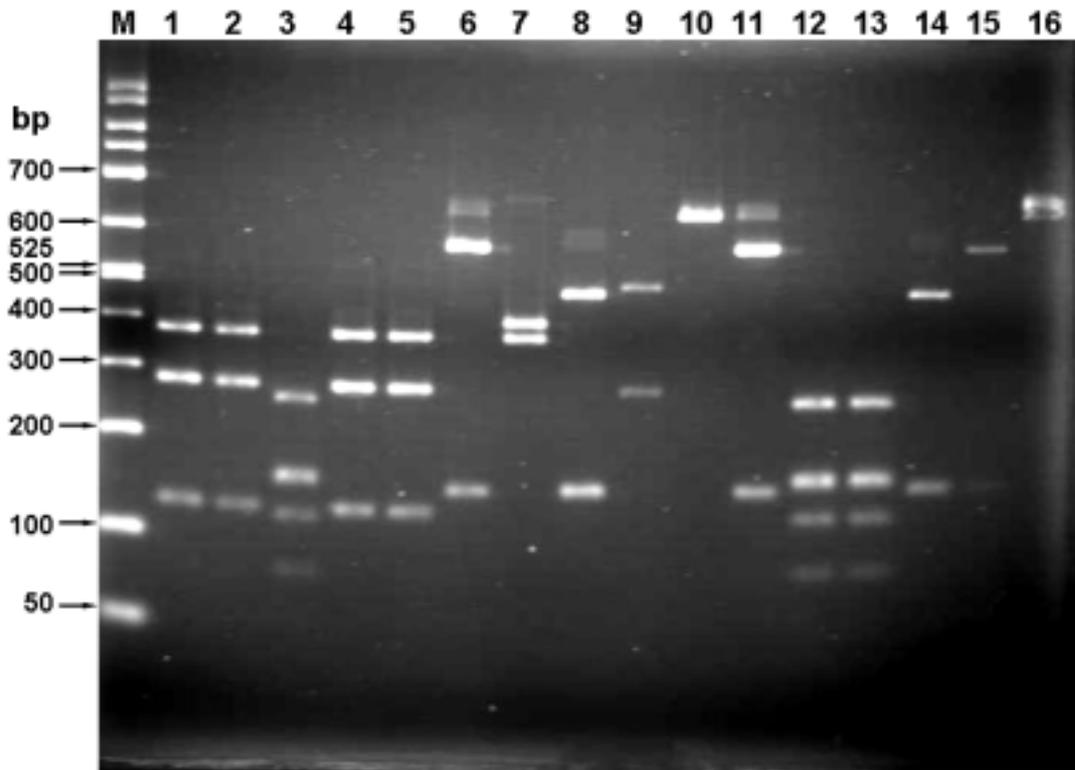
of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett. 249: 139-47.

10. Smits HL et al. 2001. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. Clin Diag Lab Immunol. 8: 166-9.
11. World Health Organization. 2003. Human leptospirosis - guidance for diagnosis, surveillance and control, pp. 1-122. World Health Organization, Malta.
12. Yang HY, Hsu PY, Pan MJ, Wu MS, Lee CH, Yu CC, Hung CC, Yang CW. 2005. Clinical distinction and evaluation of leptospirosis in Taiwan--a case-control study. J Nephrol. 18:45-53.

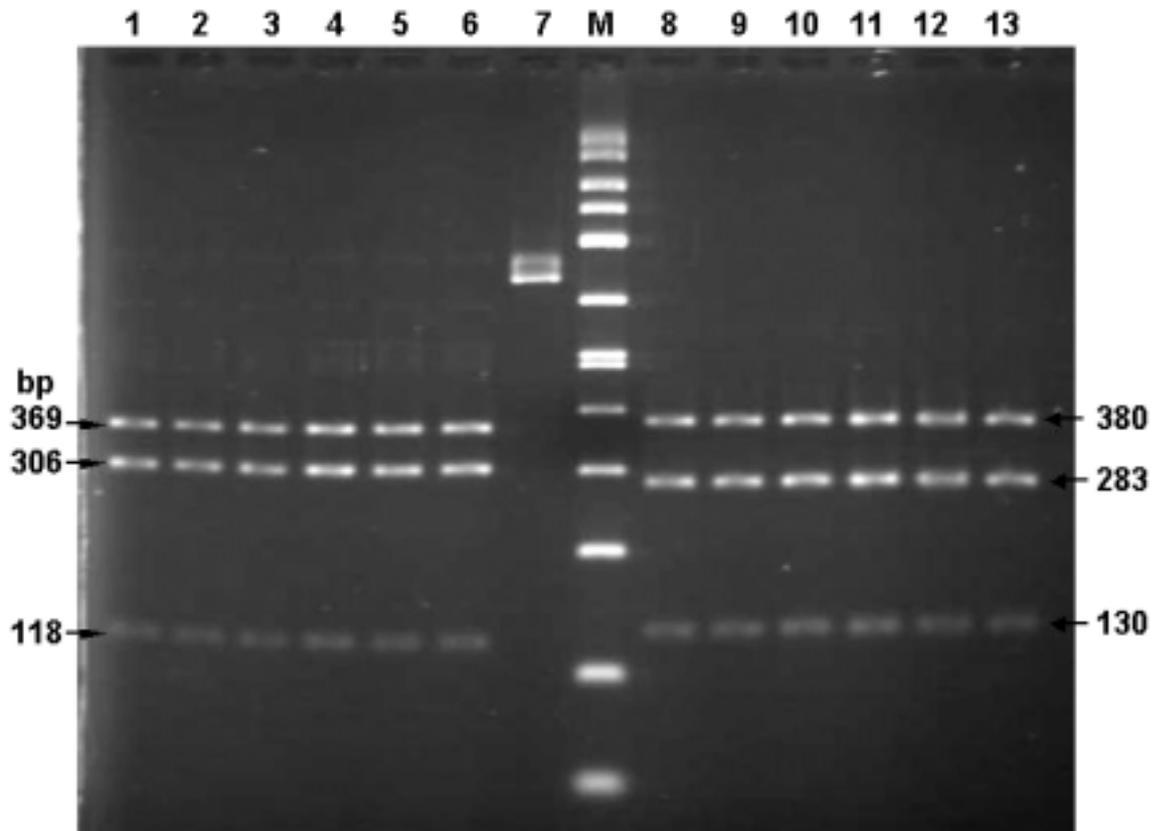
圖



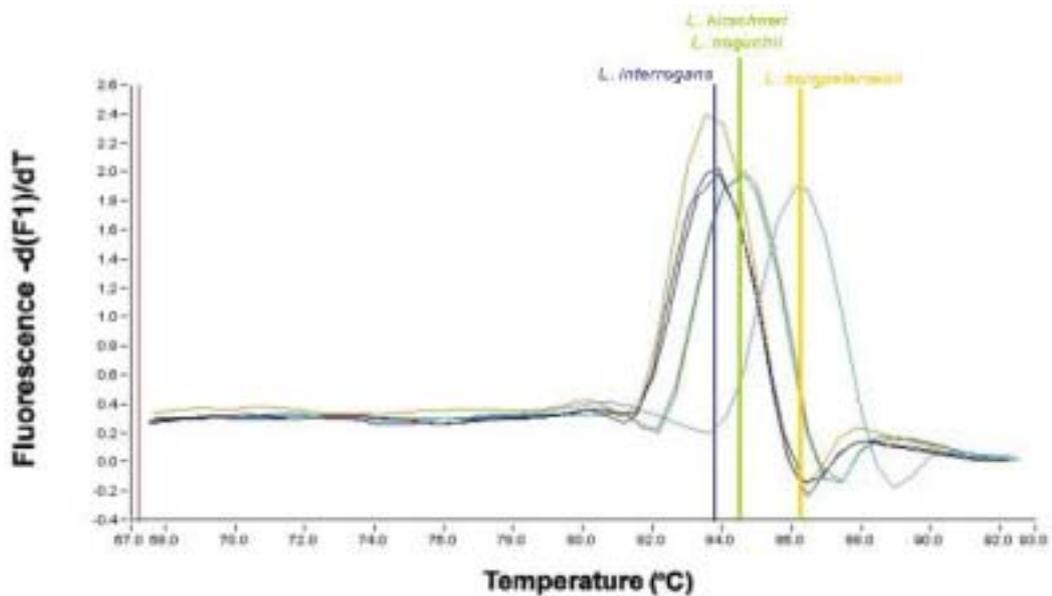
圖一、Hind III 的 *flaB* typing 結果。1: *L. interrogans* strain Jez Bratislava ; 2: *L. interrogans* strain No 8 Vcop ; 3: undefined strain ; 4: *L. interrogans* strain Izena ; 5: *L. interrogans* strain CF1 ; 6: undefined strain ; 7: *L. interrogans* strain Kremastos ; 8: *L. santarosai* strain ATCC43286 ; 9: *L. kirschneri* strain 3522C ; 10: *L. noguchii* strain CZ214 ; 11: *L. borgpetersenii* strain Poi ; 12: *L. inadai* strain 43289 ; 13: Taiwan human isolate, *L. inadai* strain CSY ; 14: Taiwan human isolate, *L. santarosai* strain CCF ; 15 Taiwan human isolate, *L. borgpetersenii* strain WJS ; 16: undigested *L. interrogans* strain CF1。



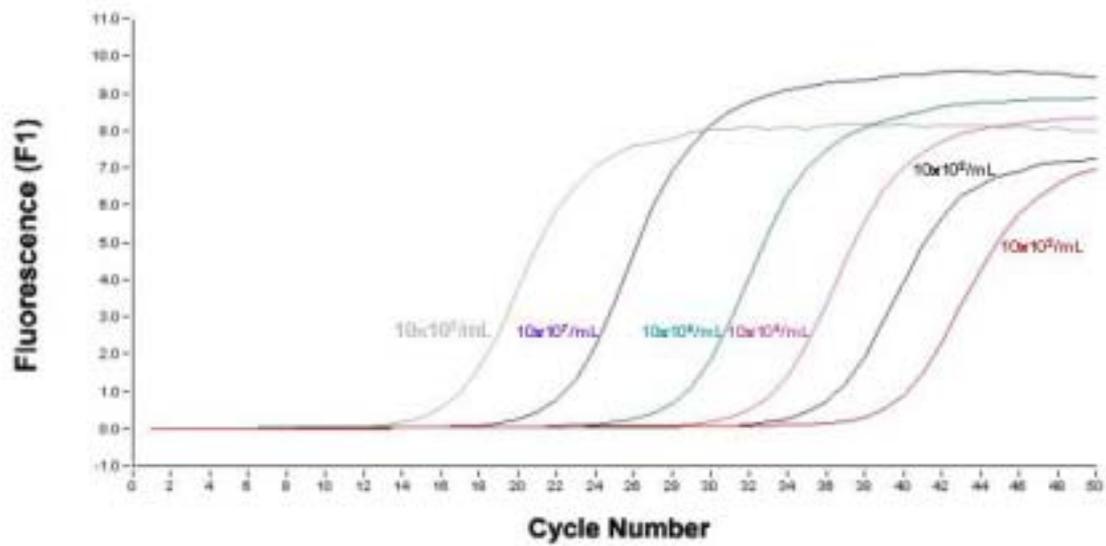
圖二、Hae III 的 *flaB* typing 結果。1: *L. interrogans* strain Jez Bratislava ; 2: *L. interrogans* strain No 8 Vcop ; 3: undefined strain ; 4: *L. interrogans* strain Izena ; 5: *L. interrogans* strain CF1 ; 6: undefined strain ; 7: *L. interrogans* strain Kremastos ; 8: *L. santarosai* strain ATCC43286 ; 9: *L. kirschneri* strain 3522C ; 10: *L. noguchii* strain CZ214 ; 11: *L. borgpetersenii* strain Poi ; 12: *L. inadai* strain 43289 ; 13: Taiwan human isolate, *L. inadai* strain CSY ; 14: Taiwan human isolate, *L. santarosai* strain CCF ; 15 Taiwan human isolate, *L. borgpetersenii* strain WJS ; 16: undigested *L. interrogans* strain CF1。



圖三、*L. interrogans* *flaB* typing 結果。1: strain Akiyami A, Hind III-digested ; 2: strain Djasima, Hind III-digested ; 3: strain Honda Utrecht IV, Hind III-digested ; 4: strain LT1026, Hind III-digested ; 5: strain Pomona, Hind III-digested ; 6: strain Van Tienen, Hind III-digested ; 7: undigested *L. interrogans* strain CF1 ; 8: strain Akiyami A, Hae III -digested ; 9: strain Djasima, Hae III -digested ; 10: strain Honda Utrecht IV, Hae III -digested ; 11: strain LT1026, Hae III -digested ; 12: strain Pomona, Hae III -digested ; 13: strain Van Tienen, Hae III -digested。



圖四、LFB1 real-time PCR 偵測鉤端螺旋體參考菌株，利用熔點曲線分析 (melting curve analysis) 區分致病性基因種。*L. interrogans* 之參考菌株 Akiyami A (黑線), Djasima (深藍線) 和 CF1 (淡棕線), 其 T_m 值=83.78。 *L. kirschneri* 參考菌株 3522C(藍綠線)和 *L. noguchii* 參考菌株 CZ214 (深棕線), 其 T_m 值=84.5。 *L. borgpetersenii* 參考菌株 Poi (水藍線), 其 T_m 值=86.22。



圖五、LFB1 real-time PCR 偵測血液內鉤端螺旋體的敏感度。以血液稀釋鉤端螺旋體參考菌株 *L. interrogans* strain CF1，其偵測極限為 100 leprospira/mL。

表

表一、本實驗所使用之引子對及其序列

引子名稱	引子序列
G1	CTGAATCGCTGTATAAACT
G2	GGAAAACAAATGGTCGGAAG
flaB-F	CTCACCGTTCTCTAA AGTTCA AC
flaB-R	TGAATTCGGCATATTTGCC
LFB1-F	CATTCATGTTTCGAATCATTTCAA
LFB1-R	GGCCCAAGTTCCTTCTAAAAG

表二、鉤端螺旋體參考菌株與臨床分離株 *flaB* typing 與 G1/G2

PCR 結果

species	strains	<i>flaB</i> -RFLP		<i>flaB</i> -typ G1/G2	
		Hind III-RFLP	Hae III-RFLP		
<i>L. interrogans</i>	Jez Bratislava, Akiyami A, No 8 Vcop, Djasiman, Izena, Honda Utrecht IV, LT1026, CF1, Pomona, Van Tienen	369+306+118	380+283+130	Ia	Y
	Kremastos	369+306+118	413+380	Ib	Y
<i>L. kirschneri</i>	3522C	487+306	510+283	IIa	Y
<i>L. noguchii</i>	CZ214	487+306	793	IIb	Y
<i>L. santarosai</i>	ATCC43286, CCF*	487+306	490+152+151	IIc	Y
<i>L. borgpetersenii</i>	Poi, WJS*	367+306+120	642+151	IIIa	Y
<i>L. inadai</i>	43289, CSY*	675+118	264+165+159+ 123+82	IV	N
<i>L. biflexa</i>	Patoc 1	-	-	-	N

* , 台灣本土分離菌株。

表三、鉤端螺旋體參考菌株與臨床分離株 LFB1 real-time PCR 方法偵測結果與 *flaB* 基因分型結果之關係

strains	Tm	Gel_EP(331-bp) ^a	species	<i>flaB</i> -type
Jez Bratislava	83.62	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
Akiyami A	83.77	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
No 8 Vcop	83.69	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
Djasiman	83.72	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
Izena	83.90	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
Honda Utrecht IV	84.01	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
LT1026	83.89	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
CF1	83.71	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
Pomona	83.86	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
Van Tienen	83.71	Y	<i>L. interrogans</i>	Ia
Kremastos	85.97	Y	<i>L. interrogans</i>	Ib
3522C	84.47	Y	<i>L. kirschneri</i>	IIa
CZ214	84.52	Y	<i>L. noguchii</i>	IIb
ATCC43286	86.87	Y	<i>L. santarosai</i>	IIc
CCF ^b	87.02	Y	<i>L. santarosai</i>	IIc
Poi	86.22	Y	<i>L. borgpetersenii</i>	IIIa
WJS ^b	86.32	Y	<i>L. borgpetersenii</i>	IIIa
43289	85.08 ^c	N	<i>L. inadai</i>	IV
CSY ^b	85.52 ^c	N	<i>L. inadai</i>	IV
Patoc 1	81.65 ^c	N	<i>L. biflexa</i>	-

a, Real-time PCR 增幅產物進行膠體電泳分析，確認專一性的 331-bp 增幅產物。B, 台灣本土分離菌株。C, 增幅出其他非 331-bp 增幅產物。

表四、臨床全血 MAT 抗體檢驗、G1 PCR、*flaB* PCR-RFLP type、
和培養檢查結果

病人 代號	年紀	採檢 日距	titer	MAT		PCR		培養	Species
				major serogrope		G1 <i>PCR</i>	<i>flaB</i> -type		
1	66	2	400	Javanica		+	IIIa	+	<i>L. borgpetersenii</i>
2	34	1	<100			-	-	-	
3	52	4	<100			-	-	-	
4	56	0	<100			-	-	-	
5	43	1	<100			-	-	-	
6	74	2	<100			-	-	-	
7	73	1	<100			-	-	-	
8	79	5	<100			-	-	-	
9	41	3	<100			-	-	-	
10	47	3	<100			-	-	-	
11	30	2	<100			-	-	-	
12	50	8	100	Australis		-	-	-	
13	50	8	<100			-	-	-	
14	49	6	<100			-	-	-	
15	48	5	1600	Shermani		-	-	-	
16	69	4	100	Shermani		-	-	-	
17	34	6	<100			-	-	-	
18	61	6	<100			-	-	-	
19	21	7	<100			-	-	-	
20	35	5	<100			-	-	-	
21	14	5	<100			-	-	-	
22	40	8	<100			-	-	-	
23	38	2	<100			-	-	-	
24	30	4	<100			-	-	-	
25	71	6	<100			-	-	-	
26	45	8	<100			-	-	-	
27	18	5	<100			-	-	-	
28	74	6	<100			-	-	-	
29	74	6	<100			-	-	-	
30	70	7	<100			-	-	-	
31	36	1	<100			-	-	-	
32	77	6	<100			-	-	-	
33	38	5	<100			-	-	-	
34	63	1	<100			-	-	-	
35	42	0	<100			-	-	-	

