

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XIX, 31

SECTIO D

1964

Zakład Antropozoonoz Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi im. W. Chodźki w Lublinie  
Dyrektor: prof. dr Józef Parnas

Adolf KOŚLAK

**Analiza szczepów leptospir kolekcji wzorcowej (WHO) oraz szczepów kolekcji krajowej przy pomocy odczynu wiązania dopełniacza (OWD)**

**Анализ штаммов лептоспир эталонного набора Всемирной организации здравоохранения (WHO), а также отечественных штаммов при помощи реакции связывания комплемента (OWD)**

**An Analysis of Strains Belonging to a Standard Collection (WHO), and that of a Collection of Polish Strains with the Complement Fixation Test (OWD)**

Podstawą klasyfikacji leptospir są odczyny serologiczne: krzyżowej aglutynacji oraz absorpcji aglutynin (1, 12, 13). Celem bliższego poznania struktury antygenowej szereg badaczy próbuje opracować inne odczyny, np. odczyn wiązania dopełniacza. Do wykonania tego odczynu stosowano różne rodzaje antygenów: antygeny z całych leptospir z dodatkiem fenolu lub formolu (2, 3, 14), merthiolatu (5, 8) lub chinozolu (9), antygeny uzyskane przy pomocy preparatyki chemicznej (4, 6, 7, 8) oraz wyciągi z hodowli gotowanych i ekstrahowanych acetonem lub alkoholem etylowym (10, 11).

Celem pracy była ocena przydatności odczynu wiązania dopełniacza do klasyfikacji leptospir przy zastosowaniu antygeny sporządzonego wg własnej modyfikacji.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na dwu grupach leptospir: 1) 36 szczepów wzorcowych WHO; 2) 9 szczepów kolekcji krajowej.

Otrzymał odpornościowych surowic homologicznych. Szczepy leptospir (tab. 2, 4) namnożone na podłożu Korthoffa (w temperaturze 28°C w przeciągu 12 dni) były antygenami używanymi do uodparniania królików. Króliki szczepiono dożylnie co 4 dni wzrastającymi dawkami hodowli: 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml. Po tygodniu od wprowadzenia ostatniej dawki sprawdzono miano i króliki skrwawiano.

Przygotowanie antygeny do odczynu wiązania dopełniacza. Każdy szczep leptospir wysiewano do 5 kolb zawierających po 200 ml. pożywki Korthoffa, które inkubowano 12 dni w temp. 28°C. Wyrośnięte hodowle wirowano przy 6000 obr./min. przez 2 godz. Do otrzymanego osadu leptospir dodawano 5 ml. płynu fizjologicznego. Zawiesinę ogrzewano w łaźni wodnej w temp. 58—60°C przez godzinę, następnie dodawano 0,2%—10% fenolu i wstawiano na okres 10 dni do lodówki (+4°C). Po tym czasie zawiesinę wirowano 10 min. przy 10000 obr./min. Supernatant był antygenem używanym do OWD. W celach porównawczych przygotowano dla serotypów *L. icterohaemorrhagiae* i *L. pomona* antygeny: gotowany i acetonowy (11) (tabl. 1).

Tab. 1. Ocena wartości antygenów leptospirozowych przygotowanych różnymi metodami

The evaluation of *Leptospira* — antigens prepared by several methods

serotyp	szczep	rodzaj antygeny	surowice homologiczne w rozcieńczeniach	
			1/64	1/128
<i>L. pomona</i>	Pomona	antygen gotowany wg Terzina	+	—
		antygen acetonowy wg Terzina	—	—
		antygen własnej modyfikacji	+++	—
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	Wijnberg	antygen gotowany wg Terzina	+++	—
		antygen acetonowy wg Terzina	—	—
		antygen własnej modyfikacji	+++	—

#### OBSERWACJE WŁASNE

Wyniki krzyżowego odczynu wiązania dopełniacza przy użyciu antygenów i surowic przygotowanych ze szczepów wzorcowych (WHO) przedstawia tab. 2.

1. Surowica anty-*L. icterohaemorrhagiae* (I serogrupa) reaguje w OWD w mniejszym lub większym stopniu z antygenami serogrup: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XIV, a częściowo XV (z *L. grippotyphosa*) i XVI (z *L. sejroe*). Odczyny przebiegają krzyżowo. Wyjątek stanowi szczep *L. bangkinang*, który jest wiązany przez surowicę anty *L. icterohaemorrhagiae* (+), natomiast surowica anty *L. bangkinang* nie wiąże antygeny *L. icterohaemorrhagiae*.

2. Serogrupa II wykazuje wyraźne powinowactwo antygenowe z serogrupą oraz z serogrupą III.

3. Serogrupa III wykazuje powinowactwo ze szczepami serogrupy I i II oraz z *L. pyrogenes* z serogrupy VIII.

4. Serogrupa IV wiąże dopełniacz z surowicami odpornościowymi serogrupy I, V, VI, oraz XII.

5. Serogrupa V wiąże dopełniacz z surowicami serogrupy I, IV i VI.

6. Serogrupa VI wykazuje powinowactwo antygenowe z serogrupami I, IV, V oraz ze szczepami *L. australis* B (VI) oraz *L. australis* AB (XI).

7. Antygen *L. ballum* (serogrupa VII) wiąże dopełniacz z surowicą odpornościową anty *L. autumnalis* AB.

8. W grupie VIII antygen *L. pyrogenes* wiąże dopełniacz z surowicami odpornościowymi anty *L. icterohaemorrhagiae*, *L. naam*, *L. sarmin*, *L. autumnalis* AB, *L. autumnalis* A, a antygen *L. australis* B z surowicami odpornościowymi anty *L. icterohaemorrhagiae* AB i *L. benjamin*.

9. Grupa IX wykazuje powinowactwo antygenowe z *L. sentot*.

10. Antygen *L. sentot* (X) wiąże dopełniacz z surowicami odpornościowymi anty *L. icterohaemorrhagiae* AB, *L. cynopteri* i *L. djasiman*.

11. Antygeny serotypu XI wiążą dopełniacz z surowicami anty *L. icterohaemorrhagiae* AB. Poza tym antygen *L. autumnalis* AB reaguje w OWD z surowicami odpornościowymi anty *L. benjamin*, *L. ballum*, *L. pyrogenes*, *L. djasiman*, *L. pomona*, antygen *L. autumnalis* A z *L. pyrogenes*, *L. djasiman*, *L. pomona*, a *L. bangkinang* z *L. wolffi*.

12. Z antygenem *L. djasiman* (XII), reaguja surowice odpornościowe anty *L. schüffneri*, *L. sentot*, *L. autumnalis* AB, *L. autumnalis* A, *L. australis* A, *L. grippotyphosa*.

13. W serogrupie XIII jedynie antygen *L. australis* A reaguje z surowicami odpornościowymi dla szczepów *L. djasiman* i *L. pomona*.

14. Stwierdzono powinowactwo antygenowe *L. pomona* (XIV) z *L. icterohaemorrhagiae* AB, *L. sarmin*, *L. pyrogenes*, *L. autumnalis* AB, *L. autumnalis* A, *L. australis* A.

15. Szczepy *L. grippotyphosa* (grupa XV) wiążą dopełniacz z surowicą odpornościową anty *L. djasiman*, a jeden ze szczepów tej grupy — *Duyster* z surowicą anty *L. icterohaemorrhagiae*.

16. W serogrupie XVI, antygen *L. wolffi* wiąże dopełniacz z surowicami anty *L. bangkinang* i *L. australis* A, a *L. sejroe* z surowicą anty *L. icterohaemorrhagiae*.

17. Serogrupy XVII, XVIII i XIX nie wykazały w OWD powinowactwa antygenowego z innymi serotypami. .

18. Antygen *L. hyos* (XX) reaguje w nieznacznym stopniu (+) z surowicą *L. poi*.

Wyniki próby OWD w ramach poszczególnych serogrup wykazują bardzo duże podobieństwo antygenowe (pełne zahamowanie hemolizy). Pełne zahamowanie hemolizy zaobserwowano także poza obrębem serogrup: antygen *L. icterohaemorrhagiae* A reagował w ten sposób z surowicami anty *L. sarmin* i *L. canicola*, antygen *L. djasiman* z surowicami anty *L. grippotyphosa*, a antygen *L. grippotyphosa* z surowicą anty *L. djasiman*. Ponieważ przeprowadzone badanie wykonane było tylko w jednym jednakowym rozcieńczeniu dla wszystkich surowic (1:10), co pozwoliło na wykazanie jedynie różnic jakościowych, przeprowadzono krzyżowy odczyn wiązania dopełniacza w kilku serogrupach z uwzględnieniem wysokości miana surowic odpornościowych (tab. 3).

Tab. 3. Krzyżowy odczyn wiązania dopełniacza w kilku serogrupach z uwzględnieniem wysokości miana surowic

The cross complement fixation test for several serogroups taking into account the degree of the serum titer

Serogrupa	Antygeny	Surowice odpornościowe		
		1	2	3
XVII	1. <i>L. bataviae</i>	1:128	1:32	
	2. <i>L. paidjan</i>	1:64	1:128	
VII	1. <i>L. pyrogenes</i>	1:32	1:16	
	2. <i>L. australis</i> B	1:32	1:32	
XI	1. <i>L. autumnalis</i> AB	1:32	1:32	1:16
	2. <i>L. autumnalis</i> A	1:32	1:32	1:32
	3. <i>L. bangkinang</i>	1:16	1:16	1:32
XIII	1. <i>L. australis</i> A	1:64	1:32	
	2. <i>L. muenchen</i>	1:64	1:64	
XV	<i>Grippotyphosa</i> :			
	1. Moskov V	1:128	1:64	1:128
	2. Duyster	1:128	1:128	1:64
	3. Bernkopf	1:64	1:64	1:128

Jak wynika z tabeli 3 przy pomocy OWD nie wykazano różnic ilościowych pomiędzy poszczególnymi serotypami. W przypadku serotypów *L. bataviae* i *paidjan* (XVII), *L. bataviae* wiąże silniej dopełniacz z surowicą hemolityczną niż z surowicą odpornościową dla szczepu *L. paidjan* i odwrotnie.

Używając antygenów przygotowanych wg metodyki własnej ze szczepów krajowych *L. grippotyphosa* (8 szczepów) i *L. bataviae* (1) nastawiono odczyn wiązania dopełniacza z surowicami odpornościowymi 36 wzorcowych szczepów leptospir. Z antygenem *L. bataviae* silnie

Tab. 4. Krzyżowy odczyn wiązania dopełniacza antygenów i surowic ze szczepów krajowych oraz odnośnych szczepów wzorcowych i ich surowic

The cross complement fixation test for antigens and sera from Polish and from standard strains and their sera

Antygeny	Surowice odpornościowe													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 L. 90/59	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:32	1:2	1:64	1:32	1:16	1:2	—
2 L. 88/59	1:16	1:64	1:16	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:4	1:32	1:16	1:64	—	—
3 L. 375/59	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	—	1:16	1:32	1:32	—	—
4 L. 378/59	1:16	1:32	1:16	1:32	1:16	1:16	1:16	1:16	—	1:16	1:32	1:16	1:4	—
5 L. 379/59	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:16	—	1:16	1:16	1:32	—	—
6 L. 380/59	1:16	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:32	—	1:16	1:32	1:16	—	—
7 L. 99/59	1:16	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:4	1:16	1:16	1:16	—	—
8 L. 75/59	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:32	—	1:16	1:32	1:32	—	—
9 L. 70/59	1:4	1:2	—	—	—	—	1:4	—	1:32	1:4	—	—	1:32	1:32
L. grippotyphosa Moskov V	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:64	1:16	1:64	1:2	1:128	1:64	1:128	1:2	—
L. grippotyphosa Duyster	1:64	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:32	—	1:128	1:128	1:64	1:4	—
L. grippotyphosa Bernkopf	1:32	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:32	1:16	1:4	1:64	1:64	1:128	1:4	—
13 L. bataviae	1:4	—	—	1:4	—	—	—	—	1:32	1:4	1:4	—	1:128	1:32
14 L. paidjan	—	—	—	—	—	—	—	—	1:32	—	—	1:4	1:64	1:128

reagowały surowice anty *L. bataviae* i *L. paidjan*, nieco słabiej anty *L. senot*, a jeszcze słabiej anty *L. sejroe* i *L. hyos*. Antygeny przygotowane z 8 szczepów krajowych *L. grippotyphosa* wiązały silnie dopełniacz (++++) z surowicami wzorcowymi serogrupy *grippotyphosa*. Antygen szczepu 380/59 wiązał dopełniacz z surowicą anty *L. sejroe*, antygen 375/59 z surowicą anty *L. autumnalis* AB (++) , a antygen 88/59 z surowicą dla szczepu *L. poi* (++) . Przy pomocy odczynu wiązania dopełniacza potwierdzono wyniki odczynu aglutynacji i wykazano, że szczep 70/59 należy do serogrupy XVII a pozostałe szczepy do serogrupy XV. Krzyżowy odczyn wiązania dopełniacza 8 szczepów krajowych z surowicami odpornościowymi, z uwzględnieniem mian przedstawia tabela 4. Jak widać, przy pomocy tej metody nie możemy zaliczyć zbadanych szczepów od określonych serotypów. Natomiast można potwierdzić do pewnego stopnia przynależność serogrupową (serogrupy XV, XVII), a jednocześnie wskazać istnienie dodatkowych komponentów antygenowych.

#### DYSKUSJA I WNIOSKI

W pracy niniejszej przeanalizowano przy pomocy odczynu wiązania dopełniacza 36 wzorcowych szczepów leptospir (tabl. 2), określonych jako odrębne serotypy. Wyniki odczynu wiązania dopełniacza wykazały pewne różnice w budowie antygenowej w poszczególnych serogrupach. Przy pomocy OWD stwierdzono szeroki zasięg powinowactwa antygenowego I serogrupy leptospir, co wskazuje na obecność komponent antygenowych, które występują w różnych proporcjach u wielu serotypów leptospir. Antygen przygotowany wg własnej modyfikacji do odczynu wiązania dopełniacza wiąże dopełniacz z serotypami leptospir zawartymi w obrębie danej serogrupy (++++). Badanie potwierdziło dane z piśmiennictwa (Terzin 1956, 1957, Bürki 1960 i inni), że zastosowanie odczynu wiązania dopełniacza daje możliwość podziału leptospir na serogrupy, aczkolwiek zdarzają się wiązania dopełniacza pomiędzy różnymi serogrupami. W wyniku analizy 9 szczepów krajowych zaliczono 8 szczepów leptospir kolekcji krajowej do serogrupy XV, obejmującej serotypy *L. grippotyphosa* i *Bernkopf*, a jeden szczep do serogrupy XVII obejmującej serotypy: *L. bataviae* i *L. paidjan*.

Reasumując, można stwierdzić, że przeprowadzony w tej pracy po raz pierwszy na tak szeroką skalę krzyżowy odczyn wiązania dopełniacza z 36 szczepami leptospir kolekcji wzorcowej i 9 szczepami leptospir kolekcji krajowej z zastosowaniem antygeny fenolowo-wodnego sporządzonego wg modyfikacji własnej, dał możliwość sklasyfikowania szczepów leptospir na serogrupy, chociaż czasami stwierdzono także

krzyżowe odczyny wiązania dopełniacza z innymi serogrupami, utrudniającę klasyfikację. Niektóre serogrupy (XVII, XVIII, XIX) nie wykazują pokrewieństwa z innymi grupami w OWD, tak że klasyfikacja ich może być przeprowadzona bez trudności. Odczyn wiązania dopełniacza nie może zastąpić, przy różnicowaniu leptospir na serotypy, stosowanej obecnie metodyki opartej na odczynie aglutynacyjnym i krzyżowej absorpcji aglutynin.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Babudieri B.: Bull. Org. mond. Santé., **24**, 45—58, 1961.
2. Dymowska Z.: Med. Dośw. i Mikr., **1**, 106—114, 1952.
3. Dymowska Z.: Med. Dośw. i Mikr., **1**, 71—94, 1960.
4. Labzoffsky N. A., Kelen A. B.: Can. J. Microb., **6**, 453—462, 1960.
5. Pike R. M., Owens H. B., Humes W.: J. Lab. Clin. Med., **44**, 609—613, 1954.
6. Schneider M. D.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **81**, 32—37, 1954.
7. Schneider M. D.: J. Inf. Dis., **94**, 297—305, 1954.
8. Schneider M. D.: Exp. Paras., **4**, 107—116, 1955.
9. Schubert J. H., Carrington L. B., Conner E., Holdeman L. V.: Amer. J. Hyg., **63**, 254—260, 1956.
10. Terzin A. L.: J. Immun., **76**, 366—372, 1956.
11. Terzin A. L.: Zbl. f. Bakt. **168**, 284—289, 1957.
12. Wolff J. W., Bohlander H. J.: Trop. Geogr. Med. **10**, 37—45, 1958.
13. Wolff J. W., Broom J. C.: Doc. Med. Geogr. Trop., **6**, 77—95, 1954.
14. Zwierz J.: Leptospirozy, Monografia, PZWL, Warszawa 1957.

#### РЕЗЮМЕ

Целью настоящей работы явилась оценка возможности применимости реакции связывания комплемента при классификации лептоспир, с применением антигена, полученного автором.

Исследования проводились на двух группах лептоспир: первая состояла из 36-ти эталонных штаммов, вторая — из 9-ти отечественных штаммов.

В результате проведенных исследований доказана применимость реакции связывания комплемента при классификации лептоспир и их подразделении на серогруппы. Установленные таким образом серогруппы совпадают с серогруппами, выделенными на основании реакции агглютинации и перекрестной абсорбции агглютинов.

Табл. 1. Оценка лептоспирозных антигенов, изготовленных различными методами.

Табл. 2. Реакция связывания комплемента штаммов лептоспир эталонного набора (ВОЗ).

Табл. 3. Реакция связывания комплемента в нескольких группах с учетом величины титра сывороток.

Табл. 4. Реакция связывания комплемента антигенов и сывороток из отечественных штаммов, а также соответствующих эталонных штаммов и их сывороток.

### SUMMARY

The objective of this work was to estimate the value of the complement fixation test for the classification of *Leptospira* with the application of an antigen, produced according to the author's modification.

The investigations were carried out in two groups of *Leptospira*, one containing 36 standard strains and the other 9 strains of the Polish collection.

The results obtained showed the usefulness of the complement fixation test for the partition of *Leptospira* into serogroups which mostly correspond to the serogroups identified by agglutination proof and agglutinin absorption.

Pracę otrzymano 20 V 1963.



Tab. 2. Krzyżowy odczyn wiązania dopełniacza leptospir wzorcowych kolekcji WHO  
The cross complement fixation test in standard Leptospira (WHO)

Serotyp	Szczep*	Sero grupa	Nr	S u r o w i c e o d p o r n o ś c i o w e**																																														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36											
icterohaemorr. AB icterohaemorr. A naam mankarso	Wijnberg Kantorowicz Naam Mankarso	I	1	++++	++++	++++	++++	++	++	++	+	+++	+	++	+	+++		+	+	+++					+++		+												++											
			2	++++	++++	++++	++++	++++	+	++++	++	++++	++																																					
			3	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	++++	+																																					
			4	++++	++++	++++	++++	++	+	++																																								
javanica poi	Batavia 46 Poi	II	5	++	+++	++	+++	++++	++++	++																																								
			6	+++	++	+++	++	++++	++++	++																																								
sarmin	Sarmin	III	7	+++	++	+++	+	+		++++																																								
schüffneri	Vleermuis 90C	IV	8	++	+++	++					++++	+++	+++																																					
canicola	Utrecht IV	V	9	+++	++	+++							++	++++	++++																																			
benjamin	Benjamin	VI	10	++	+++	++								++	+++	++++																																		
ballum	Mus 127/S 102	VII	11	++																++++																														
pyrogenes australis B	Salinem Zanoni	VIII	12	+		++					++										++++	++++																												
			13	++										+								++++	++++																											
cynopteri	VI 3868	IX	14																				++++	+++																										
sentot	Sentot	X	15	++																																														
autumnalis AB autumnalis A bangkinang	Akiyami Rachmat Bangkinang	XI	16	++											+++	+++	++																																	
			17	+++																																														
			18	+																																														
djasiman	Djasiman	XII	19												++																																			
australis A muenchen	Ballico Muenchen C 90	XIII	20																																															
			21																						++	++++	++++	+++																						
pomona	Pomona	XIV	22	+++																																														
grippotyphosa	Moskov Duyster Bernkopf	XV	23																																															
			24	++																																														
			25																																															
hebdomadis medamensis wolffii hardjo sejroe saxkoebing	Hebdomadis Hond HC 3705 Hardjoprajitno M 84 Mus 24	XVI	26																																															
			27																																															
			28																																															
			29																																															
			30	+++																																														
bataviae paidjan	van Tienen Pa'djan	XVII	32																																															
			33																																															
semeranga	Rat S 173	XVIII	34																																															
andaman A	CH 11	XIX	35																																															
hyos	Johnson	XX	36							+																																						++++		

\*— Szczepy leptospir sklasyfikowane przez Wolffa i Brooma (1954).

\*\* Wyniki krzyżowego odczynu wiązania dopełniacza.