

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXI, 16

SECTIO D

1966

Instytut Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Dyrektor: prof. dr Józef Parnas

Kazimierz ŁAZUGA

**Analiza receptorów szczepów leptospir wyizolowanych
w południowo-wschodniej Polsce**

Analysis of Receptors of Leptospira Strains Isolated in South-East Poland

PRÓBY KLASYFIKACYJNE LEPTOSPIR

Leptospiroza człowieka po raz pierwszy w świecie opisana przez Weila (1886) w r. 1888 przez Fiedlera nazwana chorobą Weila. Czynniki etiologiczne choroby Weila zostały określone przez Inada i Ido (1915), Hubnera i Reitera (1915—1916), Frommego i Uhlenhuta (1915) oraz Martina i Petita (1919). W ciągu niespełna pół wieku próbowano oprzeć klasyfikację leptospir na różnych przesłankach, jak właściwościach morfologicznych, serologicznych, biologicznych, epidemiologicznych i biochemicznych.

1. Klasyfikacja leptospir na podstawie
morfologii

Wnikliwe badania Noguchiego (1917), Martina i Petita (1919) i Zuelzer (1921—1928) nad morfologią nowo wyizolowanych krętków doprowadziły do ustanowienia, morfologicznie odrębnego rodzaju określonego i nazwanego przez Noguchiego, *Leptospira* (1917). Badania ostatnich lat przy użyciu mikroskopu elektronowego pozwoliły nieco głębiej zbadać budowę leptospir. Wypracowana przez Mortona i Andersona (1943) technika przygotowania preparatów stała się podstawą do następnych badań prowadzonych przez Babudieriego (1949), Catera (1952), Czekalowskiego i Eaves (1951, 1954, 1955), Dymowską (1959), Gangela i Themanna (1956), Parnasa i Łazugę (1957). Dzięki tym badaniom, wiemy, że leptospira składa się z cylindra cytoplazmatycznego, wielkości około 620 Å i aksostylu wielkości 220 Å, zwiniętego wokół cylindra i przylegającego ściśle do jego powierzchni. Badania w mikroskopie elektronowym ustaliły morfologiczne podobieństwo licznych szczepów leptospir, z małymi tylko odchyleniami, obserwowanymi zwłaszcza u *Leptospira ballum*, opisanymi przez Bukowca (1955) i Stanisławskiego (1958).

2. Próby klasyfikacji leptospir na podstawie własności biochemicznych

Własności biochemiczne w dobie dzisiejszej mają duże zastosowanie w bakteriologii przy klasyfikacji drobnoustrojów. W odniesieniu do leptospir własności biochemiczne jak dotychczas, nie znajdują większego zastosowania przy różnicowaniu leptospir. Dzieje się to dlatego, że metabolizm tych drobnoustrojów jest jeszcze niedokładnie poznany. Kmetz i Bakoss (1961) przebadali 19 serogrup leptospir na wytwarzanie hemolizyn i lipazy, stwierdzając hemolizyny u szczepów grupy *pomona* i *grippotyphosa*, natomiast lipazę wytwarzały szczepy z grupy *australis*, *canicola*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae* i niektóre inne grupy. Jednakże wytwarzanie lipazy i hemolizyn nie są cechami zjadliwości szczepów ani też charakterystycznymi dla danej grupy, ponieważ w tej samej grupie szczepów stwierdza się szczepy wytwarzające lipazę i hemolizyny obok szczepów nie wytwarzających. Jest to cecha niestała i nie wystarczająca do różnicowania szczepów leptospir.

3. Klasyfikacja pod względem zjadliwości dla zwierząt doświadczalnych

Z szeregu zwierząt doświadczalnych do prób biologicznych w leptospirozie najczęściej używane są świnki morskie. Pierwsi Inada i Ido (1915) stwierdzili, że *L. icterohaemorrhagiae* jest wysoce chorobotwórcza dla świnki morskiej i wywołuje u niej ciężką żółtaczkę, krwawe wybroczyny, prowadzące do śmierci zwierzęcia. Podobne spostrzeżenia zostały opublikowane przez Uhlenhutha i Frommego (1914), Adamskiego (1925), Warfołomiejewą (1949), Austoniego (1953). Szczepy *L. grippotyphosa* wywołujące gorączkę błotną są mało chorobotwórcze dla świnek morskich. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Tarasowa i Tierskich (1928), Schüffnera (1939), Babudierego (1940), Schüffnera i Bohlandera (1942—1943).

4. Klasyfikacja leptospir na podstawie własności serologicznych

Odczyny serologiczne w klasyfikacji leptospir do chwili obecnej są podstawą laboratoryjnej diagnostyki leptospiroz i określenia nowych szczepów. (Hübner i Reiter 1915), Martin i Petit 1916). Światowa Organizacja Zdrowia na Kongresie Ekspertów leptospirologii (1952, 1953) w Amsterdamie, wyznaczyła ośrodki leptospirozowe, które mają na celu opracowanie metod diagnostycznych leptospiroz oraz klasyfikację serologiczną szczepów (Wolff 1955). Obecnie do klasyfikacji szczepów leptospir zalecone są następujące metody serologiczne: 1) odczyn aglutynacji, 2) odczyn krzyżowej aglutynacji, 3) odczyn absorpcji aglutynin, i 4) odczyn wiązania dopełniacza, nie mający na razie praktycznego znaczenia.

Opracowana przez Schüffnera i Mochtara (1927) metodyka wykonania odczynu aglutynacyjno-litycznego jest podstawą w diagnostyce serologicznej i klasyfikacji leptospir. Autorzy ci polecają stosować antygeny żywe, tj. hodowle leptospir dobrze wyrosnięte, zachowując stosunek surowicy i antygeny 1:1. Surowicę stosuje się w różnych rozmiarach a wynik odczytuje się po 2—4 godzinach pod mikroskopem w ciemnym polu widzenia.

Do badania struktury antygenowej Borg-Petersen (1938) oraz Schüffner i Bohlander (1939) opracowali metodykę absorpcji aglutynin. Jest to zmodyfikowana metoda Castellaniego, używana powszechnie w badaniach nad budową antygenową bakterii.

RYS HISTORYCZNY BADAŃ NAD LEPTOSPIROZĄ W POLSCE

1. Przypadki leptospirozy w okresie 1888—1939 r. (Ryc. 1),
2. Przypadki leptospirozy w okresie 1946—1960 r. (Ryc. 2).



○ - 1 -

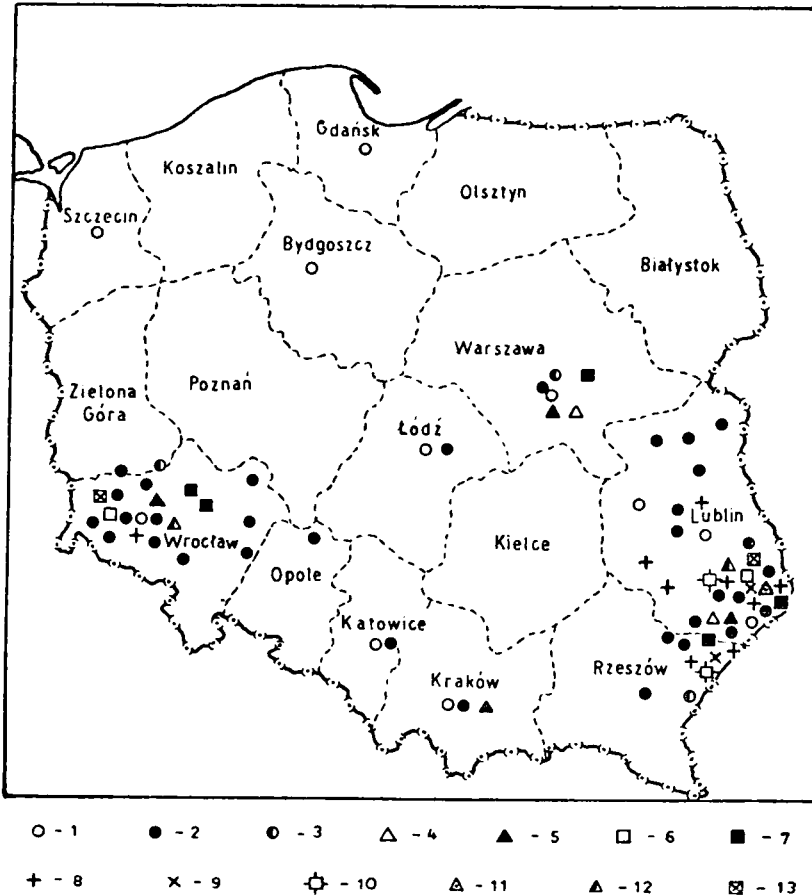
Ryc. 1. Ogniska leptospirozy na terenie Polski w latach 1888—1939

Leptospirosis foci in Poland from 1888—1939

1 — *L. icterohaemorrhagiae*

BADANIA WŁASNE

Na terenach południowo-wschodniej Polski, a ściślej mówiąc w powiatach: hrubieszowskim, tomaszowskim województwa lubelskiego oraz w przyległych do nich powiatach województwa rzeszowskiego w r. 1948



Ryc. 2. Ogniska leptospirozy na terenie Polski w latach 1946—1960
Leptospirosis foci in Poland from 1946—1960

Objaśnienia znaków — Explanations of signs

1 — *L. icterohaemorrhagiae*, 2 — *grippotyphosa*, 3 — *L. pomona*, 4 — *L. bataviae*,
 5 — *L. canicola*, 6 — *L. australis* A, 7 — *L. australis* B, 8 — *sejroe*, 9 — *L. sax-*
koebing, 10 — *L. mitis*, 11 — *L. poi*, 12 — *L. hebdomadis*, 13 — *L. autumnalis*

Chromiński wyizolował od chorych ludzi szczep *L. grippotyphosa*. Był to pierwszy szczep *L. grippotyphosa* otrzymany w Polsce. Od tego czasu do końca r. 1960 podczas ekspedycji naukowych w naturalnych ogniskach przyrodniczych leptospirozy w południowo-wschodnich rejonach Polski, wyosobniono szereg szczepów leptospir. Szczepy te zostały zakwalifikowane do 6 serogrup: *grippotyphosa*, *hebdomadis*, *javanica*, *bataviae*, *icterohaemorrhagiae* i *australis*. Pracując jako członek grupy mikrobiologicznej Zespołu Ekspedycji Leptospirozowych i współautor szeregu publikacji, otrzymałem oddzielne zadanie — zbadania właści-

wości antygenowo-serologicznych szczepów *L. grippotyphosa* izolowanych na naszym obszarze badań (południowo-wschodniej części Lubelszczyzny). Było to tym bardziej potrzebne, że D y m o w s k a analizując pięć szczepów *L. grippotyphosa* wyizolowanych na Lubelszczyźnie, stwierdziła, iż badane szczepy posiadają niejednorodną strukturę antygenową, a poza tym jeden szczep należał do grupy „Semaranga”, wcale nie pokrewnej grupie *grippotyphosa* (B a b u d i e r i i D y m o w s k a). K a r m a ń s k a, badając zaś w krzyżowym odczynie aglutynacyjnym i krzyżowym odczynie aglutynacyjno-absorpcyjnym i w badaniu biologicznym, szczep „Tomaszów I” wyizolowany w r. 1955 w powiecie Tomaszów Lubelski, twierdzi z dużym prawdopodobieństwem, że szczep ten stanowi odrębny serotyp, dla którego proponuje nazwę *L. zwierz*. Moim zadaniem było zanalizowanie właściwości antygenowo-serologicznych szczepów *L. grippotyphosa* wyizolowanych w południowo-wschodniej części Lubelszczyzny, a znajdujących się aktualnie w Muzeum Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi. Ze względów epidemiologicznych, jak również teoretycznych (analiza budowy antygenowej) zająłem się również rozpracowaniem najliczniejszej grupy szczepów leptospir, mianowicie *L. grippotyphosa*, opierając się na szerokim zestawie serotypów leptospir z Ośrodka WHO w Amsterdamie. W pracy poddałem analizie 11 szczepów *L. grippotyphosa* wyosobnionych w południowo-wschodniej Polsce i jeden szczep wyizolowany na Śląsku w porównaniu z 5 szczepami wzorcowymi. W tym celu zastosowałem metodykę typowania serologicznego (W o l f f 1954), (W o l f f i B r o o m 1954, B a b u d i e r i 1957, B a b u d i e r i 1961), opierając się na odczynie aglutynacyjnym, krzyżowym odczynie aglutynacyjnym i absorpcji aglutynin.

1. Materiały i metody

Materiałem badawczym mojej pracy były dwie grupy szczepów leptospir. Pierwsza grupa obejmowała 11 szczepów leptospir *grippotyphosa* wyizolowanych na terenach południowo-wschodniej Lubelszczyzny i jeden szczep ze Śląska, do drugiej grupy należało pięć szczepów wzorcowych z kolekcji WHO w Amsterdamie, stanowiących grupę porównawczą. Szczepy wyizolowane z południowo-wschodniej Lubelszczyzny pochodziły: nr 611 z *Cricetus cricetus*, nr 764 i 710 z *Mus musculus* ze wsi Niemirówek pow. Tomaszów Lubelski z r. 1957. Szczepy nr 75 i 88 wyizolowano z *Mus musculus*, zaś szczepy nr 99, 375, 378, 379, 380 z *Microtus arvalis* ze wsi Niemirówek rok 1959.

Szczep *L. grippotyphosa* „Tomaszów (64)” został wyizolowany w r. 1956 z krwi chorego człowieka ze wsi Niemirówek pow. Tomaszów Lubelski. Szczep *L. grippotyphosa* *Schlesien* otrzymano z kolekcji szczepów Ośrodka

Badań nad leptospirozą we Wrocławiu. Badane szczepy leptospir hodowałem na podłożu Korthoffa z dodatkiem świeżej inaktywowanej surowicy króliczej w ilości 5% oraz witaminy B₁₂ w ilości 1 mcg na 1000 ml podłoża. Szczepy przesiewałem w odstępach dwutygodniowych i trzymałem w cieplarni w temperaturze 28°C. Dla zbadania właściwości antygenowych w/w szczepów leptospir przygotowałem surowice odpornościowe dla wszystkich szczepów. Króliki o wadze 2,5—3 kg szczepiono żywą hodowlą leptospir w odstępach trzydniowych następującymi dawkami: 1 ml, 2 ml, 3 ml, 3 ml. Surowicę odpornościową od królików pobierałem jałowo po 14 dniach od ostatniego zastrzyku i przechowywałem w zamrażarce bez dodatku środka konserwującego. Porównawcze badanie struktury antygenowej szczepów wyizolowanych na Lubelszczyźnie i Śląsku oraz szczepów wzorcowych przeprowadziłem następującymi metodami: 1) krzyżowego odczynu aglutynacyjnego z żywymi szczepami (Wolff 1954, Babudieri), oraz 2) odczynu krzyżowej absorpcji aglutynin (Schüffner i Bohlander 1939, Wolff 1954).

WYNIKI BADAŃ

1. Odczyn aglutynacyjny przy użyciu żywych szczepów leptospir

W pierwszej części pracy przeprowadziłem badania serologiczne przy użyciu odczynu aglutynacyjnego z żywymi szczepami wyizolowanymi w południowo-wschodniej Polsce oraz z surowicami odpornościowymi dla 13 serogrup leptospir z Ośrodka WHO w Amsterdamie. Otrzymane wyniki zostały zestawione w tab. 1. W kolumnie pionowej tab. 1 umieszczono surowice odpornościowe dla szczepów wzorcowych z Ośrodka WHO w Amsterdamie, zaznaczając wysokość miana surowicy odpornościowej, w szeregu poziomym oznaczono szczepy badane własne. Obliczenia odczynu aglutynacyjnego wykonywałem według wytycznych Wolffa (1954). Technika odczynu aglutynacyjnego przyjęta według Wolffa przedstawia się następująco: surowicę rozcieńcza się tak, aby otrzymać następujące miana: 1/10, 1/30, 1/100, 1/300, 1/100 itd. Do tak rozcieńczonej surowicy dodaje się równą ilość żywej hodowli leptospir. Mieszaninę tę pozostawia się przez cztery godziny w temperaturze 37°C, a następnie odczytuje w ciemnym polu widzenia. Otrzymane wyniki (Wolff) wyraża się w procentach obliczanych w stosunku do miana badanej surowicy. Jak wynika z tab. 1 badane szczepy aglutynowały z surowicami odpornościowymi dla szczepów grupy *L. grippityphosa* w mianie granicznym, oznaczając jako 100%. Poza tym badane szczepy wykazywały aglutynację z surowicą *autumnalis* AB, w bardzo niskich

mianach, odpowiadających określeniu 0,1—3%. Badane szczepy nie wykazywały współaglutynacji z surowicami odpornościowymi z pozostałych serogrup. Wyniki tego odczynu wskazują, że badane szczepy należą do serogrupy *grippotyphosa*.

Tab. 1. Odczyn aglutynacyjny — Agglutination test

Surowice odpornościowe		Szczepy Leptospir
		Ilość 12
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> AB Wijnberg	1 : 80 000	—
<i>L. javanica</i> Poi	1 : 20 000	—
<i>L. canicola</i> Hond Utrecht IIV	1 : 40 000	—
<i>L. ballum</i> Mus 127	1 : 20 000	—
<i>L. pyrogenes</i> Salinem	1 : 20 000	—
<i>L. autumnalis</i> AB Akiyami A	1 : 20 000	3%
<i>L. australis</i> A Ballico	1 : 20 000	—
<i>L. ponom</i> Pomona	1 : 20 000	—
<i>L. grippotyphosa</i> Moskow V	1 : 40 000	100%
<i>L. hebdomalis</i> Hebdomadis	1 : 40 000	—
<i>L. bataviae</i> Swart v. Tienen	1 : 80 000	—
<i>L. andaman</i> A CH 11	1 : 20 000	—
<i>L. hyos</i> Mitis Johnson	1 : 20 000	—

2. Analiza szczepów żywych za pomocą odczynu krzyżowej aglutynacji

Dalsze badania nad własnościami serologicznymi własnych szczepów leptospir przeprowadziłem za pomocą krzyżowego odczynu aglutynacyj-

nego. Przy analizie wyników krzyżowego odczynu aglutynacyjnego stwierdzono, że wśród szeregu badanych surowic odpornościowych, surowica dla szczepu L. 88 wykazywała właściwości zlepne dla największej liczby szczepów, aglutynowała ona w 100% — 15 szczepów *grippotyphosa*. Surowica dla szczepu L. 764 aglutynowała w 100% — 14 szczepów *grippotyphosa*. Pozostałe surowice zachowywały się następująco: surowice dla szczepów L. 75, L. 375 i L. 710 aglutynowały w 100% — 13 szczepów *grippotyphosa*, surowice dla szczepów L. 611, i L. Schlesien aglutynowały w 100% — 12 szczepów *grippotyphosa*, surowice dla szczepów L. 99, L. 380, L. Tomaszów aglutynowały w 100% — 11 szczepów *grippotyphosa*, surowica dla szczepu L. 378 aglutynowała w 100% — 10 szczepów *grippotyphosa*, surowica dla szczepu L. 379 aglutynowała w 100% — 8 szczepów *grippotyphosa*. Na podstawie właściwości zlepnych, surowice dla L. 88, L. 764, L. 75, L. 375 i L. 710 należałoby uznać za surowice o najszerszym zasięgu aglutynin dla określenia typu *grippotyphosa* na terenach Polski. Inne surowice dla szczepów tej grupy wyizolowanych w południowo-wschodniej Polsce wykazywały nieco mniejszy zasięg aglutynin. Prawie wszystkie surowice odpornościowe dla badanych szczepów z terenu południowo-wschodniej Polski (z wyjątkiem surowicy dla L. 75) aglutynowały w 100% wzorcowy szczep *L. grippotyphosa* Moscow V, szczep uznany przez ekspertów leptospir WHO/FAO za najbardziej pełno

		Surowice odpornościowe															
		75	375	380	764	379	611	710	378	Moskow V	Tomaszów	88	Schlesien	Karniłow	Bernkopf	Andaman CH31	Duyster
Szczepy <i>Leptospira grippotyphosa</i>	75	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	375	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	380	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	764	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	379	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	611	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	710	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	378	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Moskow V	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	99	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Tomaszów	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	88	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Schlesien	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Karniłow	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Bernkopf	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Andaman CH31	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Duyster	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Ryc. 3. Odczyn krzyżowej aglutynacji
Cross agglutination test

antygeniczny i swoisty z grupy *grippotyphosa*. Badane szczepy okazały się bliższe strukturą antygenową szczepom wyizolowanym w ZSRR (szczep Karniłow, Moscow V) aniżeli innym szczepom wzorcowym. Surowice odpornościowe dla 12 badanych w tej pracy szczepów typu *grippotyphosa*, wyosobnionych w Polsce aglutynowały w 100% szczep Moscow V, w 11 przypadkach, szczep Karniłow aglutynowały w 100% — w 6 przypadkach, szczep Bernkopf wyizolowany w Izraelu aglutynowały w 100% w 6 przypadkach, szczep Andaman CH 31 aglutynowały w 100% tylko w 3 przypadkach zaś szczep Duyster był zlepiony przez te surowice w 12,5—50% (ryc. 3).

3. Wyniki odczynu krzyżowej absorpcji aglutynin

W celu dokładniejszego przebadania i ostatecznego ustalenia własności antygenowych poszczególnych badań szczepów leptospir zaliczonych na podstawie poprzednich badań do *L. grippotyphosa* użyto odczynu krzyżowej absorpcji aglutynin. Absorpcję aglutynin przeprowadzono za pomocą antygenów zabitych, przygotowanych metodą opisaną przez Wolffa (1954). Technika testu absorpcyjnego stosowana przez Wolffa jest następująca: do 100 ml dobrze wyrośniętej hodowli dodaje się 0,5% formaliny, następnie wiruje się przez 20 minut przy 10 000 obrotów/min. Dziewięć części otrzymanego osadu miesza się z jedną częścią surowicy odpornościowej, uprzednio rozcieńczonej do miana 1 : 3000. Mieszaninę tę pozostawia się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, a następnie wiruje się ją przez 5 minut przy 10 000 obrotów/min. Z płynem znad osadu nastawia się odczyn krzyżowej aglutynacji wg techniki: surowicę rozcieńcza się tak, aby otrzymać następujące miana 1 : 30, 1 : 100, 1 : 300, 1 : 1000 i 1 : 3000, do których dodaje się równą ilość hodowli zabitej formaliną. Mieszaninę tę pozostawia się przez cztery godziny w temperaturze 37°C, a następnie odczytuje w ciemnym polu widzenia. W swojej pracy zastosowałem metodę Wolffa, z tą tylko różnicą, że ze względów technicznych nie mogłem wirować przy 10 000 obrotów/min., przeto pierwsze wirowanie wykonałem przy 6000 obrotów/min. przez 120 minut, po 24 godzinach wirowałem przez 15 minut przy 6000 obrotów/min. Do badania użyłem wszystkich 12 szczepów *L. grippotyphosa* pochodzących z terenów Polski oraz 5 szczepów *L. grippotyphosa* wzorcowych z Ośrodka WHO w Amsterdamie i surowice odpornościowe dla nich.

Przy badaniu wzajemnych stosunków antygenowych w obrębie szczepów, które wg poprzednich badań okazały się przynależne do typu *grippotyphosa* stwierdzono, że wykazywały one wzajemne krzyżowe odczyny oraz wysycyły się całkowicie lub częściowo poniżej 10%, co wskazuje, że

należą do jednego serotypu. Odczyn krzyżowej absorpcji aglutynin wypadł poniżej 10% w następujących zestawieniach: Surowica dla szczepu *anty L. grippotyphosa* nr 88 wyabsorbowana antygenami *L. grippotyphosa* nr 99 i nr 379 aglutynowała w dalszym ciągu homologiczny szczep w 0,3% (wg sposobu obliczeń W o l f f a). Absorpcja surowicy dla szczepu *L. grippotyphosa* nr 99 antygenem *L. grippotyphosa* nr 88 pozostawiła aglutyniny dla szczepu homologicznego w 0,3%. Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* nr 379 wyabsorbowana szczepem *L. grippotyphosa* nr 88 aglutynowała szczep homologiczny w 0,3%. Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* nr 99 wyabsorbowana antygenami *L. grippotyphosa* Karniłow i Moskow V aglutynowała szczep homologiczny w 0,3%. Natomiast surowice dla szczepów *L. grippotyphosa* Karniłow i *L. grippotyphosa* Moskow V, wyabsorbowane antygenem *L. grippotyphosa* nr 99, aglutynowały szczepy homologiczne w mianie do 10%. Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* nr 99 wyabsorbowana antygenem *L. grippotyphosa* nr 378 aglutynowała szczep homologiczny w 10%. Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* nr 378 wyabsorbowana szczepem *L. grippotyphosa* nr 99 aglutynowała szczep homologiczny w 0,3%.

		Szczepy Leptospir						
		88	99	379	378	Karniłow	Moskow V	Bernkopf
Surowice odpornościowe	88							
	99							
	379							
	378							
	Karniłow							
	Moskow V							
	Bernkopf							
	Tomaszów							

Ryc. 4. Odczyn krzyżowej absorpcji aglutynin
Cross agglutinin absorption test

Surowice dla szczepów *L. grippotyphosa* nr 99 i nr 379, wyabsorbowane antygenem *L. grippotyphosa* Bernkopf, aglutynowały szczepy homologiczne w 0,3%, a surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* Bernkopf, wyabsorbowana antygenami *L. grippotyphosa* nr 99 i nr 379, aglutynowała szczep homologiczny również w 0,3%. Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* Tomaszów (64) wyabsorbowana antygenem *L. grippotyphosa* nr 379 aglutynowała homologiczny szczep w mianie do 10%. Surowica *anty L. grippotyphosa* nr 379 wysycona antygenem *L. grippotyphosa* Tomaszów (64) aglutynowała szczep homologiczny w granicach do 10%.

Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* nr 379 wyabsorbowana antygenem *L. grippotyphosa* Moscow V aglutynowała homologiczny szczep do 10%. Z drugiej strony surowica odpornościowa dla szczepu *L. grippotyphosa* Moscow V wyabsorbowana antygenem *L. grippotyphosa* nr 379 aglutynowała własny szczep tylko w mianie 0,3 (ryc. 4).

Ogólnie biorąc, otrzymane wyniki odczynu krzyżowej absorpcji aglutynin wskazywały na to, że badane szczepy, wyizolowane w południowo-wschodniej Polsce, należące do typu *grippotyphosa* posiadały identyczne struktury antygenowe z małymi różnicami w kilku przypadkach prawdopodobnie natury ilościowej, nie sięgającej powyżej 100%.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Ośrodek leptospirozy Światowej Organizacji Zdrowia w Amsterdamie oraz Komitet Expertów leptospir WHO/FAO zalecają, ażeby przy określeniu nowo wyisobnionego szczepu leptospir opierać się na wynikach odczynu aglutynacyjnego, krzyżowego odczynu aglutynacyjnego z żywymi szczepami i odczynu absorpcji aglutynin z antygenami formalizowanymi. 12 szczepów polskich badanych w tej pracy w oparciu o wyniki powyższych odczynów zaszeregowano do typu *grippotyphosa*. Pierwsze szczepy *L. grippotyphosa* w Polsce wyizolował od chorych na gorączkę błotną w woj. lubelskim Ch r o m i ń s k i (1948). B i l e k (1949) stwierdził występowanie tego typu leptospir w województwie rzeszowskim. Z w i e r z, D u r l a k o w a, Ł o b o d z i ń s k a (1952, 1953) opisywali ogniska gorączki błotnej na terenie Dolnego Śląska. P a r n a s, W y s o c k a, Z w i e r z, D u r l a k o w a, Ł a z u g a (1956), P a r n a s, Ł a z u g a, D ą b r o w s k i, K o ś l a k (1957), P a r n a s, Ł a z u g a, K o ś l a k (1958 i 1959), P a r n a s, K o ś l a k (1960) na podstawie analizy wyników ekspedycji w południowo-wschodniej Polsce, a w szczególności do powiatu Tomaszów Lubelski, stwierdzili, że oprócz typu *L. grippotyphosa* występuje tam szereg innych serotypów, a mianowicie: *L. sejroe*, *L. saxkoebing*, *L. sorex*, *L. bataviae*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. australis* A. Wymienieni autorzy określając stwierdzone typy leptospir nie badali ich własności antygenowych przy zastosowaniu pełnej metodyki klasyfikacyjnej. D y m o w s k a badając 6 szczepów leptospir typu *grippotyphosa*, wyisobnionych na terenie Polski, wykazała, że badane szczepy posiadają niejednorodną strukturę antygenową oraz wyróżniła 3 grupy różniące się ugrupowaniami antygenowymi: a) szczepy mające wspólny antygen dla szczepów krajowych, dla szczepów Andaman CH 31 i szczepu *L. bovis* oraz posiadające komponenty antygenowe dla typu *hebdomadis*. b) Drugie ugrupowanie antygenowe posiadające wzór antygenowy identyczny z grupą pierwszą, lecz poszczególne komponenty wykazujące mniejszą

aktywność serologiczną i c) trzecie ugrupowanie, w którego składzie antygenowym brak jest komponenty dla typu *hebdomadis*. Struktura antygenowa badanych 6 szczepów *grippotyphosa* wyosobnionych w Polsce jest bliższa szczepom izolowanym w ZSRR, niż szczepom wzorcowym z Ośrodka leptospirowego w Amsterdamie (szczep Duyster i Andaman CH 31). W r. 1955 podczas prac ekspedycyjnych nad gorączką błotną w powiecie Tomaszów Lubelski między innymi wyizolowano z krwi chorego człowieka szczep leptospira, nazwany „Tomaszów I”. Karmañska na podstawie badań serologicznych (krzyżowego odczynu aglutynacyjnego i krzyżowego odczynu aglutynacyjno-absorpcyjnego) i badań biologicznych szczepu „Tomaszów I” twierdzi z dużym prawdopodobieństwem, że szczep ten stanowi odrębny serotyp, dla którego proponuje nazwę *L. zwierz*.

Jeden ze szczepów leptospira, wyizolowany w r. 1948 przez Chroмиńskiego z krwi chorego z powiatu Hrubieszów, w szczegółowych badaniach serologicznych okazał się szczepem z grupy „Semaranga”. Jak cała grupa „Semaranga”, szczep ten aglutynowany łatwo przez surowice ludzkie dodatnie lub ujemne, winien być sklasyfikowany do leptospir wodnych (*L. biflexa*), Babudieri, Dymowska (1961). Analizując strukturę antygenową szczepów będących materiałem mojej pracy, po zastosowaniu wnikliwej metodyki badawczej, uwidoczniły się bardzo małe różnice w budowie antygenowej szczepów należących do typu *L. grippotyphosa*.

Przy analizie wyników krzyżowego odczynu aglutynacyjnego stwierdzono, że wśród szeregu badanych surowic odpornościowych, surowica dla szczepu L. 88 wykazywała właściwości zlepne dla największej liczby szczepów, aglutynowała ona w 100% — 15 szczepów *grippotyphosa*. Surowica dla szczepu L. 764 aglutynowała w 100% — 14 szczepów *grippotyphosa*. Pozostałe surowice zachowały się następująco: surowice dla szczepów L. 75, L. 375 i L. 710 aglutynowały w 100% — 13 szczepów *grippotyphosa*, surowice dla szczepów L. 611 i *L. Schlesien* aglutynowały w 100% — 12 szczepów *grippotyphosa*, surowice dla szczepów L. 99, L. 380, L. Tomaszów aglutynowały w 100% — 11 szczepów *grippotyphosa*, surowica dla szczepu L. 378 aglutynowała w 100% — 10 szczepów *grippotyphosa*, surowica dla szczepu L. 379 aglutynowała w 100% — 8 szczepów *grippotyphosa*. Na podstawie właściwości zlepnych, surowice dla L. 88, L. 764, L. 75, L. 375 i L. 710 należałoby uznać za surowice o najszerszym zasięgu aglutynin dla określenia typu *grippotyphosa* na terenach Polski. Inne surowice dla szczepów tej grupy wyizolowanych w południowo-wschodniej Polsce wykazywały nieco mniejszy zasięg aglutynin.

Prawie wszystkie surowice odpornościowe dla badanych szczepów

z terenu południowo-wschodniej Polski (z wyjątkiem surowicy dla L. 75) aglutynowały w 100% wzorcowy szczep *L.grippotyphosa* Moscow V, szczep uznany przez Expertów leptospir WHO/FAO za najbardziej pełny, antygeniczny i swoisty z grupy *grippotyphosa*. Badane szczepy okazały się bliższe strukturą antygenową szczepom wyizolowanym w ZSRR (szczep Karniłow, Moscow V) aniżeli innym szczepom wzorcowym. Surowice odpornościowe dla 12 badanych w tej pracy szczepów typu *grippotyphosa*, wyosobnionych w Polsce aglutynowały w 100% szczep Moscow V, — w 11 przypadkach, szczep Karniłow aglutynowały w 100% — w 6 przypadkach, szczep Bernkopf wyizolowany w Izraelu aglutynowały w 100% — w 6 przypadkach, szczep Andaman CH 31 aglutynowały w 100% tylko w 3 przypadkach, zaś szczep Duyster był zlepiony przez te surowice w 12,5 — 50%.

Na podstawie odczynu krzyżowej absorpcji aglutynin stwierdzono, że wykazywały one wzajemne krzyżowe odczyny oraz wysycyły się całkowicie lub poniżej 10%. Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* nr 99 wyabsorbowana antygenem L. 378 aglutynowała szczep własny w 100%. Surowica dla szczepu *L. grippotyphosa* 378 absorbowana szczepem L. 99 aglutynowała szczep homologiczny w 0,3%. Surowica dla szczepu L. Tomaszów, wysycona antygenem nr 379, aglutynowała homologiczny szczep w mianie do 10%, zaś surowica anty L. 379 wyabsorbowana antygenem L. Tomaszów aglutynowała własny szczep w 10%. Surowica dla szczepu L. 379 wyabsorbowana *L. grippotyphosa* Moscow V zlepiała homologiczny szczep do 10%, natomiast surowica dla L. Moscow V, wyabsorbowana antygenem L. 379, aglutynowała własny szczep w mianie 0,3%. Z krzyżowej absorpcji surowic dla szczepów L. 99 — L. 378, L. Tomaszów — L. 379, L. 379 — L. Moscow V, wynika, że szczepy te są serologicznie prawie identyczne, ponieważ różnice w strukturze antygenowej nie przekraczają 10%. Pozostałe szczepy badane, a mianowicie: L. 75, 88, 375, 378, 380, 611, 710, 764, Schlesien, wykazują identyczne układy antygenowe między sobą oraz w stosunku do szczepów wzorcowych *L. grippotyphosa* z Ośrodka Leptospir Światowej Organizacji Zdrowia w Amsterdamie.

O pewnych odmiennych właściwościach antygenowych szczepów *grippotyphosa* wyosobnionych w różnych krajach donoszą R i m p a u (1938, 1940) i K a t h e (1943). Szczepy wyizolowane w Bawarii w większości posiadały wspólne komponenty antygenowe ze szczepami rosyjskimi. Wolff i B o h l a n d e r (1952) stwierdzili podobne właściwości przy porównaniu struktury antygenowej szczepów L. Andaman CH 31 i *L. bovis* z *L. grippotyphosa* Moskwa V. Przy porównaniu wyników odczynu krzyżowej aglutynacji z wynikami krzyżowej absorpcji aglutynin stwierdza się: szczep L. 99 i L. 378 w krzyżowej aglutynacji wykazały: suro-

wica anty L. 378 z antygenem L. 99 aglutynowała w 50%, zaś surowica anty L. 99 z antygenem L. 378 zlepiła w 100%. W odczynie krzyżowej absorpcji aglutynin surowica dla szczepu L. 99 wysycona antygenem L. 378 aglutynowała własny szczep w mianie do 10%. Zatem różnice między tymi szczepami, odpowiadające całkowicie wymaganiom stawianym szczepom homologicznym są minimalne i pokrywają się w obu odczynach. Podobne różnice obserwuje się między szczepami L. Tomaszów i L. 379 oraz L. 379 i *L. grippotyphosa* Moscow V.

Reasumując wyniki odczynów krzyżowej aglutynacji i absorpcji aglutynin w stosunku do grupy badanych szczepów *grippotyphosa*, można powiedzieć, że między 12 badanymi szczepami tego typu nie stwierdza się dużych różnic w strukturze antygenowej. Można wśród nich wyróżnić 2 odmiany antygenowe. Pierwsza odmiana antygenowa, o identycznej budowie mozaikowej antygenów, jest reprezentowana przez 9 szczepów, do których należą L. 75, L. 88, L. 375, L. 378, L. 380, L. 611, L. 710, L. 764 i L. Schlesien. Drugą odmianę antygenową stanowią szczepy L. 99, L. 379 i L. Tomaszów posiadające jakościowy wzór antygenowy identyczny z grupą pierwszą oraz wykazujące poszczególne komponenty antygenowe nie przekraczające 10%.

WNIOSKI

Zbierając wyniki przeprowadzonej pracy, należy stwierdzić, że podane badaniom w tej pracy szczepy leptospir w liczbie 12, wyosobnione na terenach południowo-wschodniej Polski i Śląska w latach 1949—1960 należy, na podstawie wyników, odczynów krzyżowej aglutynacji z żywym antygenem oraz odczynu absorpcji aglutynin, zaliczyć do typu *grippotyphosa*.

1. 12 badanych szczepów w obrębie typu *grippotyphosa* wykazało prawie jednorodną strukturę antygenową. Można wśród nich wyodrębnić dwie grupy o mało różniących się ugrupowaniach antygenowych:

a. Pierwszą grupę reprezentują szczepy L. 75, L. 88, L. 375, L. 378, L. 380, L. 611, L. 710, L. 764 i L. Schlesien. Mają one wspólne antygeny dla szczepów krajowych oraz dla szczepów wzorcowych Ośrodka leptospir Światowej Organizacji Zdrowia w Amsterdamie (Moscow V, Bernkopf).

b. Drugą grupę antygenową stanowią szczepy L. 99, L. 379, L. Tomaszów, które posiadają wzór antygenowy identyczny z grupą pierwszą, ale poszczególne komponenty wykazują mniejszą aktywność serologiczną, nie przekraczającą 10%.

2. Budowa antygenowa 12 szczepów *L. grippotyphosa* wyosobnionych w południowo-wschodniej Polsce jest bliższa szczepom występującym na terenie ZSRR (Moscow V, Karniłow) niż innym szczepom wzorcowym z Ośrodka leptospirowego w Amsterdamie (Andaman CH 31 i Duyster).

3. Szczepy *grippotyphosa* L. 88, L. 764, L. 75, L. 375 i L. 710 ze względu na najbogatszy układ antygenowy uznać za serotypy specjalnie nadające się jako antygeny w diagnostyce serologicznej gorączki błotnej na terenach południowo-wschodniej Polski.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamski J.: Badania nad morfologią i biologią krętka żółtaczkii zakaźnej (*Leptospira icterohaemorrhagiae*) wraz z przyczynkiem do kazuistyki choroby Weila, Poznań 1924.
2. Austoni M.: Le Leptospiroosi. Tipografia del Seminario, Padua 1953.
3. Babudieri B.: Verh. D. Gesellsch. f. inn. Med. L. II. Congr. 126, 1940.
4. Babudieri B.: J. of. Hyg. 47, 390, 1949.
5. Babudieri B.: Scien. Med. Italica 4, 657, 1957.
6. Babudieri B.: Bull. Org. mond. Santé. 24, 45, 1961.
7. Babudieri B., Dymowska Z.: Zentrbl. Bakt. Parasit. Inf. Hyg. Originale 182, 129, 1961.
8. Bilek M.: Przegl. Lek. 8, 261, 1949.
9. Borg Petersen C., Fagraeus A.: Act. path. microb. scand. 26, 555, 1949.
10. Cater D. B.: Nature 169, 944, 1952.
11. Chromiński C.: Med. Dośw. i Mikrob. 3, 370, 1949.
12. Czekalowski J. W., Eaves G.: J. Bact. 67, 619, 1954.
13. Czekalowski J. W., Eaves G.: J. Path. Bact. 69, 129, 1955.
14. Gängel G., Themann H.: Arch. f. Hyg. u. Bakt. 140, 6, 1956.
15. Inada R., Jodo J., Hoki R., Ito H., Wani H.: J. Exp. Med. 29, 485, 1916.
16. Dymowska Z.: Med. Dośw. i Mikrob. 12, 71, 1960.
17. Karmańska K.: Med. Dośw. i Mikrob. 13, 19, 1961.
18. Kathe J.: Ztsch. f. Immfersch. 103, 60, 1943.
19. Kmety B., Bakoss P.: Zentrbl. Bakt. Parasit. Inf. Hyg. Originale. 181, 503, 1961.
20. Łazuga K.: Przegl. Ep. 15, 1958.
21. Martin L., Petit A.: Bull. med. 28, 398, 1916.
22. Noguchi H.: J. exp. Med. 27, 575, 1918.
23. Parnas J., Dąbrowski T., Łazuga K., Koślak A., Paroszkiewicz M.: Przegl. Epid. 1, 30, 1958.
24. Parnas J., Łazuga K.: Arch. Inst. Post. d. Tunis. 35, 1958.
25. Parnas J., Łazuga K.: Arch. Inst. Past. L. L. Tunis 35, 1958.
26. Parnas J., Łazuga K.: Rev. L. T. 33, 3, 1959.
27. Rimpau W.: Die Leptospirose. Monographie der Med. Klinik, 1950, 8.
28. Schüffner W., Mochtar A.: Zbl. f. Bakt. Parasit. Abt. I. Orig. 101, 405, 1927.
29. Schüffner W.; Acta Conventia Tertii de Tropics Morbis 407, 1938.
30. Schüffner W., Bohlander H.: Zbl. f. Bakt. Parasit. Inf. 144, 7, 8, 434, 1939.
31. Schüffner W., Bohlander H.: Zbl. f. Bakt. Orig. 149, 359, 1942.
32. Stanisławski E.: ZMEJ. 1, 19, 1958.
33. Tierskich W. J.: Leptospirozy ludzi i zwierząt. Miedgiz. Moskwa 1945.
34. Tokarewicz K. W.: Leptospirozy. Miedgiz. 1957.

35. Uhlenhuth, Fromme: Med. Klin. 44, 46, 47, 1915.
36. Warfołomiejewa A. A.: Leptospiroznyje zabołewanija czelowieka. Miedgiz. Moskwa 1949.
37. Wolff J. W., Broom J. C.: Doc. Med. Geograph. Trop. 6, 78, 1954.
38. Wolff J. W.: The Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Charles Thomas, Springfield Illinois USA, 1954.
39. Zwierz J., Durlakowa J., Łobodzińska M.: Pol. Tyg. Lek. 35, 1041, 1953.
40. Zwierz J., Durlakowa J., Sobolewska M.: Pol. Tyg. Lek. 48, 1632, 1953.
41. Zuelzer M.: Zbl. Bakt. Org. 85, 154, 1921.

Pracę otrzymano 22 XI 1961.

Анализ рецепторов штаммов лептоспир, выделенных в юго-восточной Польше

Резюме

Материалом для исследований явились две группы штаммов лептоспир. Первая группа состояла из 11 штаммов *Leptospira grippotyphosa*, выделенных в юго-восточной части Люблинской области, и одного штамма из Силезии. Ко второй группе, ставшей сравнительно-контрольной, относились 5 эталонных штаммов *L. grippotyphosa* из коллекции Всемирной организации здравоохранения в Амстердаме. Сравнительные исследования антигенной структуры рассматриваемых штаммов проводились при помощи следующих методов:

- 1) перекрестной реакцией агглютинации с живыми штаммами по методу Вольфа (1954) и Бабудьери (1960);
- 2) реакцией адсорбции агглютининов по методу Шюффнера и Боландера (1939), а также методу Вольфа (1954).

На основании результатов, полученных с помощью этих двух реакций, автор относит 12 исследуемых штаммов к виду *grippotyphosa* и приходит к следующим заключениям:

1) Двенадцать исследуемых штаммов вида *grippotyphosa* характеризуются почти однородной антигенной структурой; среди них можно выделить две группы с малыми антигенными различиями:

а) первую группу составляют штаммы 75, 88, 375, 378, 380, 611, 710, 764, Schlesien. Они обладают общими для отечественных и эталонных штаммов Лептоспирозного центра Всемирной организации здравоохранения в Амстердаме (Moskow V, Bernkopf) антигенами;

б) ко второй антигенной группе отнесены штаммы: L 99, 379, Томашув, антигенная структура которых сходна с первой группой, но от-

дельные компоненты характеризуются меньшей серологической активностью, не превышающей 10%.

2) Антигенная структура 12-ти штаммов *L. grippityphosa*, выделенных в юго-восточной Польше более близка штаммам, распространенным на территории СССР (Москва V, Корнилов), чем штаммам Лептоспирозного центра Всемирной организации здравоохранения в Амстердаме (Андаман CH 31, Duster).

3) Штаммы *grippityphosa* L. 88, 764, 75, 375 и 710 вследствие богатой антигенной структуры необходимо признать серотипами, которые можно применять в качестве антигенов в серологической диагностике безжелтушного лептоспироза на территории юго-восточной части Польши.

Рис. 1. Очаги лептоспироза на территории Польши в период 1888—1939 гг.

Рис. 2. Очаги лептоспироза на территории Польши в период 1946—1960 гг.

Рис. 3. Реакция перекрестной агглютинации.

Рис. 4. Реакция перекрестной адсорбции агглютининов.

Табл. 1. Реакция агглютинации.

Analysis of Receptors of *Leptospira* Strains Isolated in South-East Poland

Summary

The object of the present investigations were two groups of *Leptospira* strains. The first group contained 11 *Leptospira grippityphosa* strains isolated in the south-east part of the Lublin voivodeship, and one strain from Silesia. To the other group belonged 5 standard strains of *L. grippityphosa* from the WHO collection in Amsterdam, which were used as controls. Comparative investigations on the antigen structure of the experimental and standard strains were carried out by the following methods:

1. cross agglutination test with living strains (according to Wolff, 1954, and to Babudieri, 1960),

2. cross adsorption agglutinin test (according to Schüffner and Bohlander, 1939, and to Wolff, 1954).

The results of the cross agglutination test and of the cross adsorption agglutinin test indicate that the 12 *Leptospira* strains studied should be included in the *grippityphosa* type.

1. The 12 strains studied proved to be of an almost uniform antigen structure. They can be divided into two groups slightly differing from one another in their antigenic properties: a) to the first group belong the following strains: L. 75, 88, 375, 378, 380, 611, 710, 764 and Schlesien.

They have common antigens for the Polish strains and for the standard strains of the WHO Leptospira Centre in Amsterdam (Moscow V, Bernkopf). b) To the second antigenic group belong the strains: L. 99, 379 and Tomaszów, whose antigen formula is the same as in the first group, but whose individual components present a lower serological activity, which does not exceed 10 per cent.

2. The antigen structure of the 12 *L. grippotyphosa* strains isolated in south-east Poland is closer to that of the strains which occur in the USSR (Moscow V, Karnilow) than to the antigen structure of other standard strains of the Leptospira Centre in Amsterdam (Andaman CH 31 and Duyster).

3. Because of their rich antigen structure, the *grippotyphosa* strains: L. 88, 764, 75, 375 and 710 can be regarded as serotypes, which can be used as antigens for serological diagnosis of swamp fever in south-east Poland.