

# 钩端螺旋体特异性抗原的研究

## I. 钩端螺旋体红血球致敏物质的抗原分析\*

聶第楷 魏 曦 崔惠云 周 勵 張哲夫

(中国医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

关于钩端螺旋体抗原成分的研究已有不少报告。有些学者采取免疫化学途径, 试图分析钩端螺旋体的抗原结构及其免疫学性能; 其中最值得注意的是: Schneider<sup>[1]</sup>从黄疸出血型、巴达维亚型及犬型钩端螺旋体分离出多糖质抗原; Rothstein<sup>[2,3]</sup>等从各种不同型别的钩端螺旋体提取了具有血清学活性的物质。另一些学者从实际出发, 为钩端螺旋体病的血清学诊断找到了具有实际意义的诊断抗原; 张氏和 McComb<sup>[4]</sup>及 Cox<sup>[5,6]</sup>等的研究是这方面显著的例子。张氏和 McComb<sup>[4]</sup>从5株钩端螺旋体首次制备了钩端螺旋体的红血球致敏物质(ESS), 能致敏人的O型血球, 在同型或异型钩端螺旋体抗血清的作用下血球凝集; Cox<sup>[5,6]</sup>用类似张氏和 McComb<sup>[4]</sup>的方法从钩端螺旋体提取出溶血抗原, 能致敏绵羊红血球, 在抗血清和补体的作用下血球溶解。Cox 认为其溶血抗原与张氏的红血球致敏物质相同或相似。

钩端螺旋体抗原成分的研究对其血清型别的鉴定有着重要的意义。因为钩端螺旋体的型别复杂, 迄今尚无满意的分型方法, 唯一的技術是用凝集溶解试验及交叉凝集吸收试验。但此法操作复杂, 既费时又费力, 在一般实验室难以采用。长期以来, 我们试图解决这个问题, 希望找到一种简单可靠的型别鉴定法, 求其易于推广。我们注意到张氏及 McComb<sup>[4]</sup>的红血球致敏物质(ESS)只做过诊断抗原使用, 而未做过血清学分析。通过一系列的血清学研究, 我们发现红血球致敏物质内不但有红血球致敏抗原(以下简称致敏抗原), 同时还另有一种抗原, 即型特异凝集溶解抗原(以下简称凝集抗原)。凝集抗原是一种独特的抗原, 其含量很高。用取得的抗原注射家兔可以获得高效价的免疫血清。将制成的免疫血清分别对12型钩端螺旋体进行凝集溶解试验, 出现了极明显的型特异反应。个别血清系由浓缩抗原制成, 出现了微弱的交叉凝集反应; 但这并不妨碍各血清型相互之间的鉴别作用。

本文就12个不同型钩端螺旋体的红血球致敏物质, 用血清学方法研究凝集抗原的存在情况及其特异性, 并以1株黄疸出血型钩端螺旋体的红血球致敏物质为代表所作的抗原成分分析, 报导于下。

## 材 料 和 方 法

**菌种** 钩端螺旋体红血球致敏物质是由下列菌型提取的, 即黄疸出血型(*L. icterohaemorrhagiae*-Verdun)、犬型(*L. canicola*-C7)、流感伤寒型(*L. grippotyphosa*-Schlesica)、波蒙那型(*L. pomona*-Australis)

\* 参加技术操作的有马桂兰和朱桂凤。

本文为中国微生物学会1963年学术年会转稿。

C)、牛型(*L. bovis*)、色若型(*L. sejroe*)、七日热型(*L. hebdomadis*)、巴达维亚型(*L. bataviac*)、秋季热型(*L. autumnalis*)、澳洲乙型(*L. australis* B-Zanoni)、澳洲甲型(*L. australis* A-Ballico)及396型(*L. 396*)。这些菌种为作者之一于1955年自罗马尼亚 Cantacuzino 研究所带回,保存于 Терских 培养基,每月移种1次,培养于28℃ 孵箱。通常接种后6—9天,菌数即可达到高峰。用作提取红血球致敏物质的培养物,菌数是每视野(物镜45×及目镜10×)50条以上。

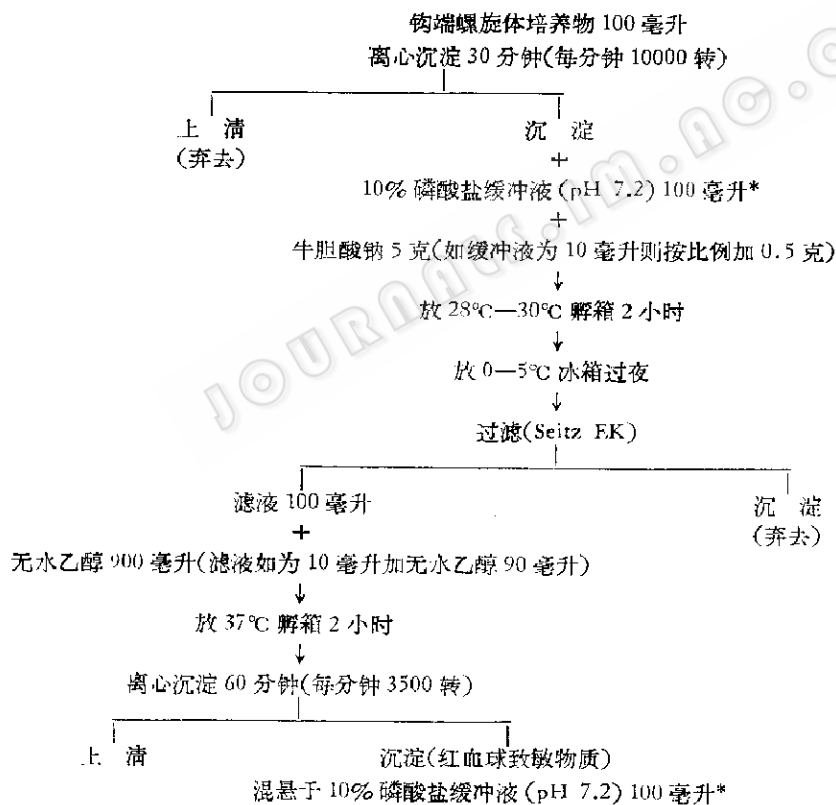
**红血球致敏物质的制备** 除下述几点外,基本上是按张氏及 McComb<sup>[4]</sup> 的“胆盐酒精法”制备的。

1. 首先将钩端螺旋体培养物离心沉淀30分钟(每分钟1万转),沉淀用10% Sørensen 缓冲液(pH 7.2)洗两次,然后将其混悬于相同的缓冲液内。加入的缓冲液可与原培养物同量或仅为其1/10容量(制备浓缩的红血球致敏物质)。

2. 将胆盐溶解的钩端螺旋体用 Seitz EK 滤板过滤,以除去残余未溶解的菌体。

3. 90% 乙醇沉淀出来的红血球致敏物质混悬于10% Sørensen 磷酸盐缓冲液(pH 7.2),其容量与原培养物相同。但试验中有几批制备的红血球致敏物质是从10倍浓缩的钩端螺旋体菌体提取,并混悬到相当于原培养物容量的1/10。本文中所述的浓缩的红血球致敏物质即指此(图1)。

图1 钩端螺旋体红血球致敏物质的提取步骤



\* 在制备浓缩的红血球致敏物质时所加缓冲液量为10毫升。

**从红血球致敏物质中分离型特异凝集抗原** 按 Cox<sup>[6,7]</sup> 法,将红血球致敏物质悬液用兔红血球吸收。经过多次(在我们的试验条件下至少是5次,最多是12次)吸收以后,不再致敏红血球(兔及绵羊红血球),红血球溶解试验为阴性,即不复含有致敏抗原。但在注射后却能刺激家兔产生型特异凝集抗体。因此,用红血球多次吸收红血球致敏物质可以将型特异凝集抗原从其中分离出来。

**补体结合反应抗原的制备** 将菌数为每视野约100条的钩端螺旋体培养物离心沉淀(每分钟3000—3500转)60分钟。取沉淀的菌体用含0.3%石炭酸的生理盐水稀释到原培养物容量的1/10,充

分混合,作成均匀的悬液,放于 2—5℃ 冰箱 10 天,即可用作补体结合抗原。

**抗血清的制备** 选择无自然抗体,体重为 1.5—2.5 公斤的健康家兔用作制备抗血清。

1. 全菌抗血清的制备: 将菌数为每视野 50 条以上的培养物加热到 56℃、30 分钟灭活,由耳静脉注射 4—5 次,每次 2 毫升,间隔 5—7 天,末次注射 7—10 天后放血。血清从凝块分离后,56℃ 30 分钟灭活并加 0.02% 硫柳汞,置 4—8℃ 冰箱备用。

2. 红血球致敏物质抗血清的制备: 除上述注射次数外,再多注射两次,其他与全菌抗血清的制备方法相同。

3. 红血球致敏物质吸附于兔红血球上以制备抗血清: 将浓缩的红血球致敏物质吸附于兔红血球上,按 Cox<sup>[7]</sup> 所述方法进行,惟所用稀释液为 pH 7.0 的磷酸盐缓冲生理盐水而非 veronal 缓冲液。每次注射 2% 致敏红血球悬液 2 毫升,其他与全菌抗血清相同。

4. 红血球致敏物质用兔红血球吸收后作抗原制备抗血清: 按 Cox<sup>[6,7]</sup> 法将浓缩的红血球致敏物质用兔红血球多次吸收,直到不再致敏红血球(红血球溶解试验呈阴性,其具体操作法见后文)即用作抗原。注射剂量、途径及次数等与制备全菌抗血清相同。

### 血清学试验

1. 凝集溶解试验: 将培养 6—10 天的鈎端螺旋体活菌液(菌数为每视野 50 条左右,无自然凝集块)用作抗原;血清从 1:50 开始作一系列对倍稀释,直到 1:51,200,个别情况达到 1:100,000 以上。选取清洁的小试管,每管加入 0.1 毫升稀释的血清及同量抗原,混合后于 28℃ 孵箱放两小时,然后在暗视野显微镜下观察结果。溶菌现象常常在血清稀释倍数低的情况下出现,有时在较高倍数稀释下与凝集现象同时出现,但在抗血清高度稀释下很难看到。因此,血清效价的判定是根据凝集反应而不凭溶解反应。凝集反应的强度系根据见到的有小蜘蛛状凝集块的视野数目而划分为显著、中等及轻度。每 10 个视野(物镜 45× 及目镜 10×)中有 1—3 个视野出现典型的小蜘蛛状凝集块作为轻度;4—7 个视野为中等度;8—10 个视野为显著;未见到典型的小蜘蛛状凝集块则为阴性。出现轻度凝集反应的血清最高稀释倍数为该血清的凝集效价。

2. 补体结合试验: 在滴定抗血清中补体结合抗体的效价时,用生理盐水(pH 7.0)将血清作对倍稀释,从 1:10 到 1:320;同时抗原也作对倍稀释,从 1:2 到 1:64。抗血清的最高稀释度同时又是抗原的最高稀释度而能显现 2+ 结合的为该血清的滴度。具体作法是:抗血清及抗原分别为 0.1 毫升,补体及溶血系各为 0.2 毫升,每管总量为 0.6 毫升。补体是用两个单位溶血素致敏的红血球(1%)滴定。血清滴定时用两个恰定单位的补体,即按上述容量将稀释了的抗血清与抗原混合,并加入两个恰定单位补体,于 37℃ 结合 30 分钟,然后加入溶血系(两个单位溶血素致敏了的 1% 红血球悬液),同样放 37℃ 水浴中 30 分钟,记录结果。对照包括:试验的血清、正常阴性兔血清、抗原、致敏的红血球及补体(分别设置含 2½、2、1½、1 及 1/2 单位补体的对照管)的确实用量。

3. 红血球溶解试验: 红血球致敏方法系将 1 份 10% 的绵羊红血球与 10 份红血球致敏物质混合,置 37℃ 水浴 1 小时,然后用生理盐水将血球洗 3 次,作成 0.5% 混悬液。试验血清作对倍稀释,从 1:40 开始到 1:1,280。每个稀释度的血清 0.2 毫升分别加 1:10 稀释的补体 0.2 毫升及致敏了的 0.5% 红血球悬液 0.2 毫升。混合后将试管置 37℃ 水浴中 1 小时,记录结果。对照包括:试验血清、阴性血清、红血球(致敏血球及未致敏血球)及补体。试验前所有试验的血清及所用的补体均用绵羊红血球进行吸收以除去可能出现的正常溶血素。效价的确定以血清最高稀释度而能显现完全溶血者为准。

## 结 果

(一) 鈎端螺旋体红血球致敏物质的凝集原性 在开始一段工作中,经重复试验结果,12 型鈎端螺旋体的红血球致敏物质除犬型、秋季热型、流感伤寒型及 396 型等 4 个型

別以外,其他 8 型都能刺激家兔产生凝集溶解抗体(表 1)。因此,与全菌抗原相比,出現了一定的差异,有必要进一步探索其原因。

表 1 鈎端螺旋体紅血球致敏物质及全菌抗原的凝集原性

鈎端螺旋体的型別	兔 血 清	
	全 菌 抗 血 清	紅血球致敏物质的抗血清
	凝 集 效 价 1:	
黃 痘 出 血 型	51,200	6,400 25,600
犬 型	51,200	— (6,400) — (3,200)
七 日 熱 型	25,600	12,800 51,200
澳 洲 甲 型	51,200	1,600 —
澳 洲 乙 型	51,200	25,600 12,800
波 蒙 那 型	51,200	1,600 25,600
流 感 傷 寒 型	51,200	— (51,200) — (12,800)
牛 型	51,200	200 400
秋 季 熱 型	51,200	— (12,800) — (6,400)
色 若 型	51,200	6,400 1,600
巴 達 維 亞 型	51,200	6,400 6,400
3 9 6 型	51,200	— (6,400) — (6,400)

注: 括弧內的數字为浓缩的紅血球致敏物质抗血清的凝集效价。

“—” = 血清 1:100 稀释为阴性。

犬型等四型鈎端螺旋体的紅血球致敏物质沒有刺激家兔产生凝集溶解抗体,这可能是由于所注射的紅血球致敏物质质量不足。根据这一設想进行了另一次試驗。将浓缩的紅血球致敏物质注射家兔,其步骤与上述方法相同,結果产生了显著的凝集溶解抗体(表1)。

(二) 鈎端螺旋体紅血球致敏物质抗血清中凝集抗体的特异性 交叉凝集溶解試驗結果表明,抗血清中的凝集溶解抗体是型特异的(表 2)。但有几批浓缩的紅血球致敏物质的抗血清却不尽相同;它們虽与同型鈎端螺旋体呈強烈的凝集反应,但也与一些异型鈎端螺旋体起反应(表 2)。这一点将在后面予以討論。

(三) 紅血球致敏抗原与型特异凝集抗原的关系 从上述几次試驗結果不难看出,鈎端螺旋体的紅血球致敏抗原与型特异凝集抗原,两者之間似乎存在着不可分割的关系。两者究竟是同一的或不同的物质? 这一問題是一个具有理論和实际意义的关键性問題。我們提出两种設想。第一、紅血球致敏物质中的致敏抗原与凝集抗原是不同的物质,可以

表 2 钩端螺旋体红血球致敏物质家兔抗血清中凝集抗体的特异性

钩端螺旋体红血球致敏物质的家兔抗血清	免疫家兔编号	抗原：活钩端螺旋体											
		黄疸出血型	七日热型	澳洲甲型	澳洲乙型	牛型	巴达维亚型	波蒙那型	色若型	秋季热型	396型	流感伤寒型	犬型
红血球致敏物质家兔抗血清的凝集效价1:													
黄疸出血型	27	6,400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	28	25,600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
七日热型	1	—	12,800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	37	—	51,200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
澳洲甲型	33	—	—	1,600	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	34	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
澳洲乙型	29	—	—	—	25,600	—	—	—	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	12,800	—	—	—	—	—	—	—	—
牛型	31	—	—	—	—	200	—	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—
巴达维亚型	35	—	—	—	—	—	6,400	—	—	—	—	—	—
	36	—	—	—	—	—	6,400	—	—	—	—	—	—
波蒙那型	3	—	—	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	25,600	—	—	—	—	—
色若型	8	—	—	—	—	—	—	—	6,400	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—
秋季热型*	38	—	100	—	—	—	—	100	—	12,800	—	—	—
	39	—	—	—	—	—	—	—	—	6,400	—	—	—
396型*	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6,400	—	—
	41	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
流感伤寒型*	42	—	—	—	—	12,800	—	—	—	—	—	51,200	—
	43	100	—	—	—	200	—	—	—	—	—	12,800	—
犬型*	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6,400
	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,200
黄疸出血型*	46	51,200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200
	47	51,200	—	100	800	—	—	—	400	200	—	—	200
家兔红血球吸附以浓缩的黄疸出血型钩端螺旋体红血球致敏物质*	48	6,400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
黄疸出血型钩端螺旋体红血球致敏物质*经家兔红血球5次吸收以后	49	100,000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	50	6,400	—	—	—	200	—	—	—	—	—	—	1,600
	51	50,000	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—

\* 浓缩的红血球致敏物质，“—” = 血清 1:100 稀释为阴性。

設法从它們的混合物中将两者分开,从而分別試驗它們各自的生物学特性。換句話說,在紅血球致敏物質制剂經過紅血球多次吸收后,一类抗原会被吸收掉,另一类抗原会留在基質中,这一基質給家兔注射后就不再产生紅血球溶解抗体,而仍然产生凝集抗体。第二、它們是同一种物質,很难分开。也就是說,紅血球致敏物質制剂被紅血球多次吸收后,所有抗原都会吸附在紅血球上,基質之中不再存在其他抗原。这一基質給家兔注射后既不产生紅血球溶解抗体,也不产生凝集抗体。

根据以上設想,曾用 1 株黃疸出血型鈎端螺旋体按前述方法提取紅血球致敏物質并进行試驗(見方法項下)。在試驗中为了避免异种紅血球可能引起不必要的溶血反应,采用了同种紅血球,即家兔紅血球来吸收有关的抗原。試驗結果見表 3。可以看出,紅血球致敏物質原制剂給家兔注射后产生了 3 种抗体,即凝集抗体、紅血球溶解抗体及补体結合抗体(抗血清 1 号及 2 号)。吸附在紅血球上的同样制剂也产生了相同的抗体(抗血清 3 号及 4 号)。但这一制剂被紅血球吸收 5 次后,只产生了两种抗体,即凝集抗体及补体結合抗体(抗血清 5 号及 6 号)。有必要补充一句,即补体結合抗体与凝集抗体之間似乎存在很密切的关系,虽然补体結合抗体的滴度不高,但是比較穩定,总是伴随着凝集溶解抗体并与其同时出現。有一只免疫家兔(編号 51)没有产生这种抗体,可能是由于試驗动物对抗体产生的个体差异。值得注意的是,凝集抗体的效价比补体結合抗体的效价更为穩定,其上升的幅度也更为显著。因此,本試驗对抗原抗体作用的評价,在抗原方面側重于

表 3 黃疸出血型鈎端螺旋体的紅血球致敏物質原制剂及經不同方法处理后的制剂注射家兔后所产生的抗体反应

抗血清編号	免 疫 家 兔 編 号	免 疫 抗 原	血 清 学 反 应		
			凝集溶解試驗	紅血球溶解試驗	补体結合試驗
			效 价 1:		
一	52	紅血球致敏物質原制剂 (未用免紅血球吸收)	50,000	320	40
二	53		50,000	320	40
三	48	紅血球致敏物質吸附在 免紅血球上	5,400	160	40
四	49		100,000	320	80
五	50	紅血球致敏物質用免紅 血球吸收五次后的基質	6,400	—	40
六	51		50,000	—	—

“—” = 血清 1:10 稀釋为阴性。

凝集抗原与致敏抗原的对比;在抗体方面側重于凝集溶解抗体与紅血球溶解抗体的对比,而将补体結合抗原置于次要的地位看待。显然,紅血球致敏物質原制剂中至少存在着两种重要抗原,即凝集抗原及致敏抗原(免 52 号及 53 号的凝集抗体均为 1:50,000;紅血球溶解抗体均为 1:320)。但同一制剂被紅血球吸收 5 次以后,則无可以測出的致敏抗原,而凝集抗原仍然存在于基質中(免 50 号及 51 号的凝集溶解抗体分別为 1:6,400 及 1:50,000;同样两只免的紅血球溶解抗体均为阴性)。試驗結果与以上所提第一种設想符合。因此,可以断言,紅血球致敏物質中的致敏抗原及凝集抗原是两种不同的抗原。換句話說,紅血球致敏物質至少是两者的混合物。这与 Cox<sup>[6]</sup> 对其溶血抗原分析的結果是相

似的。

## 討 論

张氏及 McComb<sup>[4]</sup> 提取紅血球致敏物質的方法之所以优越, 原因在于采用了高浓度乙醇(90%)沉淀法。张氏曾經証明, 紅血球致敏物質在 50—66% 的乙醇中能被溶解, 在 90% 的乙醇中能被沉淀出来。从过去的許多工作来看, 采用什么浓度的乙醇来提取抗原是一个重要的关键。Cox<sup>[6]</sup> 在这方面也做了一些工作, 其結果肯定了张氏的試驗。但由于 Cox 采取了先用低浓度乙醇(50%)溶解, 后用高浓度乙醇(90%)沉淀的方法来提取抗原, 从其报告中可以看出, 用这个方法所获得的凝集抗原量是比較少的, 因而所制出的抗血清的凝集效价也就比較弱。在用低浓度乙醇提取抗原的过程中, 看来有不少抗原(指抗原量), 特别是凝集抗原未能充分地从小端螺旋体提取出来。

当紅血球致敏物質被紅血球吸收时, 吸附在紅血球上的物質, 从简单的推理来設想, 应当只是單純的致敏抗原。但事实說明, 被吸附的物質中既有致敏抗原也有凝集抗原。从实验数据来看, 紅血球致敏物質被紅血球多次吸收后的結果是比較彻底的, 經過吸收后, 沒有可以測出的致敏抗原, 但在吸收后的基質中还发现了大量的凝集抗原。这个結果是十分显著的。至于紅血球吸附致敏抗原与凝集抗原的机制問題, 現在还不清楚, 有待进一步闡明。

实验数据表明, 凝集抗原的型特异凝集抗体反应是显著的。但在少数情况下, 也曾出現过非特异或异质性凝集抗体反应。例如有几批濃縮的紅血球致敏物質注射家兔后出現了交叉凝集抗体(表 2)。但同质性凝集抗体的效价还是超过了异质性凝集抗体的效价。問題在于如何解释这种非特异或异质性反应。根据現有的实验数据还很难說明。我們設想, 小端螺旋体中的蛋白質是負責异质性反应的基础。但在 90% 乙醇中这种蛋白質会变性, 使异质性抗原(蛋白質)失去抗原性。是否有可能部分蛋白質未彻底变性, 因此殘余的抗原性被保存下来。在抗原制剂未被濃縮时, 由于含量太少, 不能刺激家兔产生相应的抗体, 因此在凝集反应中也表現不出交叉凝集反应; 当抗原制剂一經濃縮, 具有抗原性的殘余蛋白質的含量也增加了, 因此造成在表 2 中所見的异质性交叉凝集反应。

小端螺旋体各型菌种之間关于型特异凝集抗原的含量似乎存在着一些差异(表 1)。除了个别的菌型(澳洲甲型)是由于家兔的个体差异, 在两只兔中有 1 只未产生凝集抗体外, 还有些菌型, 如犬型、流感伤寒型、秋季热型及 396 型在它們的紅血球致敏物質未經濃縮时, 都未产生凝集抗体, 但一經濃縮都产生了凝集抗体(表 1)。这种情况的形成可能如前面所提到的是由于所注射的紅血球致敏物質質量不足。換句話說, 在提取抗原的过程中, 存在一些技术上的問題, 以致沒有获得足够量的抗原。另一方面也可能由于菌型之間存在着本質上的差异, 不同菌型的凝集抗原存在着差別。按現在的情况来衡量, 提取較為純淨的凝集抗原有了一定的基础。这对于研究凝集抗原的理化特性及免疫化学問題提供了有利的条件; 此外, 在实际应用上也可能有助于小端螺旋体的血清型別鉴定。三种制剂(紅血球致敏物質原制剂、紅血球吸附了抗原的制剂以及吸收后的基質制剂)中的任何一种都可以用来制备型特异性凝集反应免疫血清, 但用紅血球致敏物質原制剂較為簡單方便。

## 結 語

(一) 用 90% 乙醇从 12 个不同型的钩端螺旋体提取了紅血球致敏物質并以之免疫了家兔。通过凝集溶解試驗, 在免疫血清中发现了效价較高的凝集抗体。每一型血清对相应的钩端螺旋体具有显著的型特异性。

(二) 以 1 株黄疸出血型钩端螺旋体为代表, 提取了紅血球致敏物質并对其中的抗原成分进行了血清学分析。結果表明: 紅血球致敏物質至少含有两种抗原, 即凝集抗原及致敏抗原。

(三) 用紅血球吸收方法处理了紅血球致敏物質并以吸附了抗原的紅血球及吸收后的基質分別免疫了家兔。从吸附了抗原的兔紅血球免疫血清中不仅检出了紅血球溶解抗体, 同时也检出了凝集抗体, 說明紅血球不但可以吸附致敏抗原, 也可以吸附凝集抗原。但在吸收后的基質免疫血清中則无可以检出的紅血球溶解抗体, 而仍有高效价的凝集抗体, 說明用紅血球吸收的方法可以将紅血球致敏物質中的致敏抗原除去。这些結果, 对进一步研究钩端螺旋体的抗原特性打下了有利的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Schneider, M. D.: *J. Infect. Dis.*, **94**:297—305, 1954.
- [2] Rothstein, N. and Hiatt, C. W.: *J. Immunol.*, **77**:257—265, 1956.
- [3] Rothstein, N. and Wolman, F.: *J. Infect. Dis.*, **105**:280—287, 1959.
- [4] Chang, S. M. and McComb, D. E.: *Amer. J. Trop. Med.*, **3**:481—489, 1954.
- [5] Cox, C. D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**:610—615, 1955.
- [6] Cox, C. D. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**:265—269, 1958.
- [7] Cox, C. D.: *J. Infect. Dis.*, **101**:203—209, 1957.



## STUDIES ON THE SPECIFIC ANTIGENS OF LEPTOSPIRA

### I. ANTIGENIC ANALYSIS OF THE ERYTHROCYTE SENSITIZING SUBSTANCE (ESS) OF LEPTOSPIRA

NIEH DI-KAI, WEI HSI, TSUI HWEI-YUNG, CHOW LI AND CHANG TSE-FU

(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Peking*)

In an attempt to study the erythrocyte sensitizing substance (ESS) of leptospira extracted by the method of Chang and McComb for its antigenic composition, it was discovered by serological analysis that the ESS consisted of at least two important antigenic components, i.e., 1. the ESS proper and 2. a factor (agglutinin) responsible for the production of agglutination-lysis antibodies. Furthermore, it was also shown that the sera produced from the agglutinin exhibited marked type specificity. The experiments were carried out as follows:

The substance obtained from the procedure described in the paper was inoculated into rabbits intravenously in the following forms, viz., 1. the original preparation of ESS, 2. the ESS adsorbed onto rabbit's red cells and 3. the material from repeated adsorption with red cells. The immune sera produced after the injections of these three varieties of antigenic substances were each tested for variations in titre in regard to the agglutination-lysis reaction, hemolysis of sheep red cells and complement fixation. It was found that in the sera immunized with the original preparation of ESS, antibodies for agglutination-lysis, complement fixation and hemolysis of sheep's red cells were all present. The same was found in the serum prepared from ESS adsorbed onto rabbit's red cells. However, the serum produced by the material from repeated adsorption with red cells was devoid of detectable antibodies for hemolysis of sheep's red cells, but nevertheless was quite potent in agglutination-lysis and weak for complement fixation tests. In the light of these experiments, it can be concluded that at least two important antigenic components were existing in the ESS of leptospira, i.e., the reactive substance of ESS (ESS proper) and the agglutinin, and that the ESS proper could be removed from the mixture by repeated adsorption with rabbit's red cells. It, therefore, indicates that these two reactive elements are independent antigenic entities.

Comparative studies of sera prepared from the ESS of 12 different sero-types of leptospire showed that the titres in agglutination-lysis reaction with the homologous type-strains were high while those with the heterologous type-strains were either inhibited or markedly diminished. Thus a high degree of type specificity was revealed in the sera by these cross serological tests.