

钩端螺旋体炭凝集试验的研究

1. 钩端螺旋体免疫炭血清制备方法的探讨*

鲍 行 豪

(浙江省卫生防疫站, 杭州)

本文对钩端螺旋体免疫炭血清制备的适宜条件、影响因素以及炭凝集试验的敏感性、特异性及稳定性等作了一些初步探讨。对制备中活性炭自发凝集现象进行了讨论, 并提出了消除办法。

试验证明, 钩端螺旋体免疫炭血清的制备, 以上海化学纯活性炭为好。研钵中研磨结合, 时间以 30 分钟为宜。其吸附温度从 20—37℃ 之间没有差别。用高效价 (1:12,800 以上) 免疫血清以 pH 7.0—7.4 磷酸盐缓冲液作 20—30 倍稀释最为理想; 而滴度较低的免疫血清, 稀释成 1:400—1:600 间, 吸附于活性炭微粒亦可; 同份免疫血清, 吸附次数以 1—3 次为宜; 炭粒研磨得愈细, 对反应的结果观察愈清楚。

活性炭自发凝集现象与溶液中所含血清量有密切关系; 当低于 1% 时就容易出现自发凝集。但可用加入稳定剂 (正常灭活兔血清或可溶性淀粉溶液等) 来消除。

钩端螺旋体炭凝集试验抗原以溶解性为好。对同群、同型抗原的敏感性和特异性较高, 对其他致病性钩端螺旋体高浓度时也有交叉反应, 但和其他属细菌未发现交叉凝集现象。免疫炭血清的活性及效果是稳定的, 冰箱保存 14 个月及室温 (20—28℃) 保存 3 个月, 仍无减弱其活性的趋向。因此, 钩端螺旋体免疫炭血清有使用于钩端螺旋体病的快速诊断及菌株快速鉴定的可能。

炭凝集试验是将抗体 (免疫血清) 事先吸附在活性炭微粒上, 然后用此种带有抗体的活性炭微粒与相应的抗原作用, 从而以观察活性炭微粒的凝集来判定被检材料中相应抗原的存在。因此, 本法是检出病原体特异性抗原的一种血清学方法。由于此反应具有操作简便, 得出结果迅速, 敏感性和特异性高的特点^[1-5], 国内外在鼠疫、霍乱、伤寒、痢疾及土拉菌等疾病的诊断和鉴别诊断方面, 已有比较广泛的研究^[1-7]。而对鼠疫杆菌及野兔热杆菌的快速检出和鉴定, 已被应用于实践^[7, 11]。但在钩端螺旋体炭凝集试验的研究方面, 国内外尚未见报道。

本文主要目的在于通过钩端螺旋体炭

凝集试验的研究, 探索钩端螺旋体免疫炭血清制备的适宜条件及影响因素, 以便制备钩端螺旋体免疫炭血清, 为检出钩端螺旋体病患者血液中相应抗原及钩端螺旋体菌株的快速鉴定, 提供新的诊断方法。

材料和方法

一、材料

1. 菌株 国内钩端螺旋体标准菌株 13 群 14 型。

2. 活性炭 上海化学纯活性炭 (新中国化学厂出品, 批号 642); 颗粒状活性炭 (色层分析

* 钱锦玉同志参加部分工作, 本文承罗海波同志审阅, 特此致谢。

本文于 1973 年 10 月 4 日收到。

用,上海活性炭厂出品,批号 71—8909);化学纯活性炭(中国医药公司上海批发站分装,批号 627)。使用前在 80—100℃ 烤箱烤 8 小时。

3. 免疫血清 采用国内标准黄疸出血群(型)钩端螺旋体菌株免疫家兔获得,其滴度在 1:6,400—1:51,200 (显微镜凝集试验法)^[8,9]。

4. 正常兔血清 系采用无钩端螺旋体自然抗体健康家兔血液,分离血清,经 56℃ 30 分钟灭活后备用。

5. 磷酸盐缓冲液 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 1.41 克,磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.47 克,氯化钠(NaCl) 6 克,溶于 1 升蒸馏水中。pH 7.2—7.4。

二、方法

1. 免疫炭血清的制备 称取活性炭 0.2 克,置清洁干燥研钵中仔细研磨 10 分钟(研磨得愈细愈好),加入用 pH 7.2—7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 20—30 倍的钩端螺旋体免疫血清 6 毫升,在室温(20℃ 以上)继续研磨结合 30 分钟,离心,上清液可保存再用。沉淀炭粒用 1% 灭活正常兔血清磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。最后沉淀炭粒悬浮于 10 毫升 1% 硼酸 2% 正常兔血清盐水中,充分混匀,离心(500 转/分) 2 分钟(除去较粗炭粒),吸出上清液(含有较细炭粒)于另一试管中,冰箱保存备用。如用于快速诊断及菌种鉴定,须再离心沉淀(3000 转/分) 10 分钟,吸弃上清液,保留 2 毫升原液,使沉淀炭粒悬浮其中,作玻片凝集试验用。

并以同样操作法,用灭活正常兔血清代替免疫血清,制备 1 份正常炭血清,作为对照。

2. 抗原的制备 取钩端螺旋体 7—10 天培养物,先在暗视野显微镜下计数,然后离心沉

淀(1 万转/分) 30 分钟,除去上清液,沉淀作成约 8 亿/毫升菌悬液,56℃ 加温 30 分钟;杀设备用。

3. 炭凝集试验方法 用含 1% 正常兔血清磷酸盐缓冲液稀释的 0.1 毫升不同浓度抗原悬液,与 0.1 毫升经充分摇匀的同一浓度免疫炭血清于清洁之 4×5 孔塑料板上进行试验,以 0.1 毫升含正常兔血清磷酸盐缓冲液加等量免疫炭血清作对照;与此同时,用 0.1 毫升不同稀释度抗原悬液,各加等量正常炭血清作比较。充分摇动塑料板 3—5 分钟,加盖,在室温中(试验时温度在 22—28℃ 之间)静置 2 小时,在白色背景下观察结果。

4. 结果判定 凝集炭微粒均匀铺于孔底,边缘不易辨别或呈卷曲样下垂,液体透明者(4+);凝集炭微粒均匀铺于孔底,边缘可见但不整齐,有下垂趋向,液体透明(3+);凝集炭微粒在孔底形成一个较大的球状,边缘呈锯齿状,周围可见许多小凝集块,液体尚透明者(2+);凝集炭微粒在孔底聚集成团,边缘不光滑,有细小凝集块,液体稍清者(1+);凝集炭微粒于孔底聚集成团,边缘光滑或液体不清,与对照相同者为(—)。

试验结果

一、不同牌号活性炭制备钩端螺旋体免疫炭血清的效果 使用三种不同牌号活性炭分别制备免疫炭血清与不同浓度相应抗原作炭凝集试验。结果(表 1)表明,不同牌号活性炭制备免疫炭血清,其效果有一定差异,以上海化学纯活性炭最好。因此,以后试验均使用上海化学纯活性炭。

表 1 不同牌号活性炭制备免疫炭血清效果的比较

活性炭名称	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
颗粒状层析炭	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—
上海化学纯炭	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	—	—
化 学 纯 炭	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	—	—

二、制备免疫炭血清时结合方法的比较 用一种活性炭与相同稀释度之免疫

血清,按静置、研钵研磨及电磁搅拌等三种方法结合(时间为 30 分钟),制备免疫炭血

清。结果(表2)表明,研磨及电磁搅拌法效果相同,而静置结合稍差,但研钵研磨结

合更为简便。

表 2 活性炭与免疫血清结合方法的比较

结 合 方 法	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
静 置	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—	—
研 磨	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—
电 磁 搅 拌	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	—	—
正常炭血清(对照)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

三、吸附时间对免疫炭血清效果的影响
用活性炭制备钩端螺旋体免疫炭血清,以研磨结合方式,吸附时间分 10、30、60、90 及 120 分钟,用此种不同吸附时间

所制成的免疫炭血清和不同浓度相应抗原作炭凝集试验。从表 3 看出,吸附时间以 30、60 及 90 分钟效果较好。

表 3 吸附时间对免疫炭血清效果的影响

吸 附 时 间 (分)	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
10	4+	3+	2+	2+	1+	1+	—	—	—
30	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—	—
60	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—	—
90	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—	—
120	4+	4+	2+	2+	2+	1+	—	—	—
正常炭血清(对照)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

四、pH 对制备免疫炭血清效果的影响
使用不同 pH 磷酸盐缓冲液稀释免疫血清,制备免疫炭血清,并用同样 pH 的磷酸盐缓冲液洗涤和稀释免疫炭血清,与

不同浓度相应抗原作炭凝集试验。结果(表 4)表明,免疫炭血清制备时 pH 要求不严, pH 6.4—7.4 吸附后反应效果基本一致,但 pH 大于 7.8 则反应强度有所降低。

表 4 不同 pH 对制备免疫炭血清效果的影响

免疫炭血清制备 和 反 应 时 pH	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
6.4	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—	—
7.0	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—	—
7.4	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—	—
7.8	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—	—
8.2	4+	4+	3+	2+	1+	1+	—	—	—
正常炭血清(对照)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

五、吸附温度对免疫炭血清效果的影响
用一种活性炭与同一稀释度的免疫

血清,分别在不同温度条件下进行吸附,观察温度对制备免疫炭血清的影响。结果

(表5)表明, 活性炭吸附钩端螺旋体免疫血清温度在20—37℃时, 效果基本相同; 温度在4℃及56℃则所制备的免疫炭血清效果显著下降。

表5 吸附时温度对免疫炭血清效果的影响

吸 附 时 温 度 (℃)	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
4	4+	4+	2+	1+	—	—	—	—	—
20	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—
28	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—
37	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—
56	4+	4+	2+	2+	1+	1+	—	—	—
正常炭血清(对照)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

六、不同稀释度免疫血清制备免疫炭血清效果比较 将1:51,200滴度的黄疸出血群免疫血清, 稀释1:10、1:30、1:50、1:100、1:200及1:400倍, 在同一温度和相同时间(30 分钟), 以研磨方式制备免疫炭血清与相应抗原作炭凝集试验。结果(表6)表明, 用不同稀释度免疫血清制备的免疫炭血清, 其反应效果是有显著差别的。1:51,200免疫血清稀释10—50倍, 效果相同, 稀释度增加, 反应滴度明显下降。

表6 不同稀释度免疫血清制备免疫炭血清效果比较

免疫血清稀释度	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
1:10	4+	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—
1:30	4+	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	—
1:50	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	—
1:100	4+	4+	3+	2+	1+	1+	—	—	—
1:200	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—	—
1:400	4+	3+	1+	—	—	—	—	—	—
正常炭血清(对照)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

七、免疫血清滴度对制备免疫炭血清质量的影响 使用不同滴度的免疫血清, 以磷酸盐缓冲液作1:30 稀释, 分别制备免疫炭血清, 与不同浓度相应抗原作炭凝集试验。从表7 可以看出, 免疫炭血清的质量随免疫血清滴度增高而增高。

表7 免疫血清滴度对制备免疫炭血清质量的关系

免疫血清滴度	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
1: 6,400	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—	—	—
1:12,800	4+	4+	3+	2+	2+	1+	1+	—	—
1:25,600	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	—
1:51,200	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	—
正常炭血清(对照)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

八、一次吸附与多次吸附对免疫炭血清效果的影响 使用黄疸出血群、爪哇群及波摩那群钩端螺旋体免疫血清以同一牌号活性炭,按 30:1(即 3 毫升稀释免疫

血清加 0.1 克活性炭)分别进行 1、2、3、4 及 5 次吸附,时间为 30 分钟。将各次吸附所制备的免疫炭血清与相应抗原作定量炭凝集试验。

表 8 一次吸附与多次吸附对免疫炭血清的效果比较

钩端螺旋体血清及其稀释度(滴度)	吸附次数	吸附时出现情况	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对照
			8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
黄疸出血群 1:20 (1:12,800)	1	未自凝	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
	2	”	4+	4+	4+	4+	2+	2+	1+	—	—
	3	”	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	—
	4	自凝	3+	2+	1+	1+	—	—	—	—	—
	5	”	2+	2+	1+	1+	—	—	—	—	—
	正常炭血清(对照)		—	—	—	—	—	—	—	—	—
爪哇群 1:10 (1:12,800)	1	未自凝	4+	4+	4+	3+	1+	—	—	—	—
	2	”	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
	3	”	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
	4	”	4+	4+	4+	4+	2+	1+	—	—	—
	5	自凝	4+	4+	3+	3+	1+	—	—	—	—
	正常炭血清(对照)		—	—	—	—	—	—	—	—	—
波摩那群 1:20 (1:25,600)	1	未自凝	4+	4+	4+	3+	1+	—	—	—	—
	2	”	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—	—
	3	”	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
	4	自凝	3+	2+	1+	—	—	—	—	—	—
	5	”	3+	2+	1+	—	—	—	—	—	—
	正常炭血清(对照)		—	—	—	—	—	—	—	—	—

结果(表 8)表明,黄疸出血群免疫血清经活性炭吸附三次,其炭凝集效果相同,而吸附至第 4、5 次,炭粒出现自凝,滴度显著下降。爪哇群及波摩那群免疫血清,第 3 次吸附所制成的免疫炭血清均比 1、2 次为佳。看来不同批号钩端螺旋体免疫血清所制备的免疫炭血清,其效果是有显著差别的。

九、钩端螺旋体免疫炭血清的特异性试验 使用黄疸出血群(型)免疫炭血清与钩端螺旋体 13 群 14 型标准菌株的不同浓度抗原作炭凝集试验。结果(表 9)表明,免疫炭血清与相应抗原凝集效果最好;而与其他 12 群 13 型高浓度抗原呈现不同程

度低交叉反应。

再用同一免疫炭血清与伤寒、痢疾、霍乱菌及脑膜炎双球菌等作玻片凝集试验,未发现非特异的交叉凝集现象。

十、免疫炭血清与不同方法处理抗原反应效果观察 以同一浓度菌液制备的溶解抗原(0.3% 酚溶解)、酒精提取抗原(50% 酒精溶解,90% 酒精沉淀)^[10]、灭活抗原(56℃ 30 分钟加热)及活菌抗原的不同稀释度,分别与同一免疫炭血清作炭凝集试验,结果以溶解抗原效果最好,灭活抗原次之,活菌抗原稍差。

另外,我们又用不同培养时间的活抗原(3 个月、2 个月、1 个月及 8 天)与免疫

表 9 黄疸出血群免疫炭血清与 13 群 14 型抗原交叉凝集试验结果

试 验 菌 株 名 称	与不同浓度抗原(菌数/毫升)反应结果								对 照
	8 亿	8000 万	800 万	80 万	40 万	20 万	10 万	5 万	
黄疸出血群沃登不完全型	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—	—
爪哇群	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—	—
犬群	2+	—	—	—	—	—	—	—	—
拜伦群	2+	—	—	—	—	—	—	—	—
致热群	3+	1+	—	—	—	—	—	—	—
秋季热群	4+	2+	1+	—	—	—	—	—	—
澳洲群	3+	1+	—	—	—	—	—	—	—
波摩那群	4+	3+	2+	1+	—	—	—	—	—
流感伤寒群	4+	1+	—	—	—	—	—	—	—
日日热群	2+	1+	—	—	—	—	—	—	—
七利热群	3+	1+	—	—	—	—	—	—	—
巴达维亚群	3+	1+	—	—	—	—	—	—	—
豕豕亚群	2+	—	—	—	—	—	—	—	—
蜜耗 1 型	3+	—	—	—	—	—	—	—	—

炭血清作玻片凝集试验。结果培养时间在 1 个月以上的抗原与相应免疫炭血清反应强度比培养 8 天的抗原要强。

十一、钩端螺旋体免疫炭血清的稳定性 制备好的钩端螺旋体免疫炭血清，在不同条件下能够保存多久，我们作了初步观察。采用黄疸出血群免疫血清制备免疫炭血清，分 2 份装于有塞的小瓶中，分别保存于冰箱(4℃但不能冰冻)及温室(20—28℃)，每隔一定时间测定其与相应抗原反应强度。从制备时起，冰箱保存 14 个月，室温保存 3 个月(观察中的最长时间)，免疫炭血清效果没有改变。

讨 论

本文对钩端螺旋体免疫炭血清的制备

条件及影响因素，作了初步摸索。试验证明：不同牌号活性炭对被制备的免疫炭血清质量有一定影响，上海化学纯活性炭吸附抗体的活力较大，颗粒状层析炭则较小。这些差异可能与活性炭本身表面积及其吸附活性有关。我们虽然没有比较活性炭微粒大小对炭凝集试验的效果，但在实验过程中发现较粗炭粒可影响结果的观察。因此在制备免疫炭血清时，事先将活性炭研细是必要的，进而以 500 转/分离心 2 分钟，除去较粗炭粒。用含有较细炭粒的免疫炭血清作试验，结果明显可辨。

据资料报道，某些活性炭有自发凝集现象^[3,4]。作者在实验中发现制备免疫炭血清时，活性炭自发凝集现象的出现与稀释血清中所含血清量有密切关系，用

1:10—1:100 稀释的免疫血清制备免疫炭血清,自发凝集现象较少出现;如果用 1:100 以上稀释度之血清,或不加血清之盐水及蒸馏水与活性炭作用,试验了三种牌号活性炭均出现自发凝集。但此种自发凝集现象可用加 1—2% 正常兔血清或 2% 量可溶性淀粉溶液来消除。因此可以推测,活性炭微粒本身具有疏水性质,当溶液中没有一定量稳定剂存在时,则可出现自发凝集现象。所以在免疫炭血清制成后,特别是正常炭血清,检定其是否有自发凝集现象还是十分必要的,同时也可在制备好的免疫炭血清中加一点稳定剂来增强其稳定性。

免疫炭血清的质量,首先取决于免疫血清的质量^[1],当免疫血清滴度较低时(1:6400)与同一浓度抗原反应强度减弱;当免疫血清滴度高于 1:12,800 时,出现阳性反应的菌量可以减少,因此,免疫血清的滴度愈高,免疫炭血清的质量就愈好。其次还受吸附次数的影响。免疫炭血清质量,在一定范围内随着吸附次数增加而提高,本文吸附 3 次比 1、2 次为优。但有时(如表 8 中黄疸出血群)免疫炭血清质量随吸附次数增加而降低。然而,应该指出:在制备免疫炭血清时,如不出现炭粒自凝,每种钩端螺旋体免疫血清,都可用活性炭吸附 2—3 次,而所制得的免疫炭血清的质量不变或提高(表 8)。当一次吸附的免疫炭血清质量较差时,采用 2—3 次吸附往往能获得合格产品。

关于制备免疫炭血清时免疫血清稀释度问题,一方面要考虑到免疫血清的滴度,另一方面也要注意所制备免疫炭血清的

反应效果。试验结果指出,1:12,800 以上滴度的免疫血清一般以稀释 20—30 倍为宜。滴度较低的免疫血清,其稀释后滴度在 1:400—1:600 间者,用来制备免疫炭血清,其效果也是好的。

据资料报道,炭凝集试验用于其它微生物诊断时,其敏感性和特异性均很高。而用于钩端螺旋体炭凝集试验,每毫升有 5 至 10 万条钩端螺旋体时,可以出现“1+”凝集反应。此外,免疫炭血清的活性是比较稳定的,这就为基层单位现场使用提供了方便条件。

钩端螺旋体免疫炭血清与相应抗原凝集效果最好,而对其它各群(型)高浓度时亦有低交叉反应。但与它属细菌尚未发现交叉凝集,因此,初步认为有较高的特异性,同时也提示了是否可用一定浓度抗原与免疫炭血清作用来鉴定菌种,这是值得作进一步研究。

参 考 资 料

- [1] Яфаев, Р. Х.: Ж. Микробиол. Эпидет. Иммунобиол. (9) 93, 1963.
- [2] Яфаев, Р. Х.: Ж. Микробиол. Эпидет. Иммунобиол., (5) 23, 1963.
- [3] Яфаев, Р. Х.: Ж. Микробиол. Эпидет. Иммунобиол., (10) 33, 1963.
- [4] Сироко, А. Л. и др.: Вестн. АМН СССР, 5: 23, 1960.
- [5] 白常乐等: 流行病学杂志, 3(1): 16, 1965.
- [6] Яфаев, Р. Х.: Военно-мед. Журн., 5: 53, 1963.
- [7] 白常乐等: 流行病学杂志, 3(1): 20, 1965.
- [8] Schüffner, W. et al: Zbl. Bakt., Labt. Orig., 101: 405, 1927.
- [9] Gochenour, W. S. et. al: Amer. J. Publ. Health, 43: 405, 1953.
- [10] Vosta, J.: Bull. Hyg., 39 (9): 998, 1964.
- [11] 白常乐等: 流行病学杂志, 3(1): 12, 1965.

STUDIES ON CARBON AGGLUTINATION TEST FOR *LEPTOSPIRA*

I. AN EXPLORATION ON THE METHOD

PAO HSING-HAO

(Hygienic and Anti-infectious Disease Station of Chekiang Province, Hangchow)

This report describes an examination into the conditions and factors for the preparation of the *Leptospira* antiserum adsorbed on to carbon particles and its use in the agglutination test for the diagnosis of leptospirosis. The auto-agglutination of the carbon particles and the method of its elimination were also presented.

After much experience, the following conditions were finally considered to be optimal for the preparation of the *Leptospira* antiserum carrier: 1. the use of activated carbon "Shanghai" of C. P. grade; 2. adequate adsorption at 30 minutes at 20—37°C, for 1 to 3 times; 3. the use of high titre antiserum (over 1:12,800) diluted 20—30 fold with phosphate buffer, pH 7.0—7.4, but if this is not available, low titre serum diluted to a final titre of 1:400 to 1:600 could also be used.

The size of the carbon particles greatly influenced the result of the agglutination, and it appears that the soluble portion of the *Leptospira* antigen was distinctly better than the whole organism. The activity of the serum adsorbed carbon particles remained stable in the refrigerator for approximately 14 months, and for at room temperature 3 months.

The sensitivity and specificity of carbon agglutination test for *Leptospira* were found to be higher for the homologous type than for the heterologous types, and it showed no cross reactivity with other species of microorganisms. After a preliminary study of the test showing identical results with the conventional slide agglutination test, it was considered that this method might be an useful and rapid test for the diagnosis of Leptospirosis and for the identification of the *Leptospira* strains.