

## EVALUACION DE ANTIGENOS DE LA ENVOLTURA EXTERNA DE *LEPTOSPIRA* EN LAS PRUEBAS DE FIJACION DE COMPLEMENTO Y DE HEMAGLUTINACION PARA LA LEPTOSPIROSIS<sup>1</sup>

Dr. Donald M. Myers

*Se encontró que en las pruebas de fijación de complemento y hemaglutinación pasiva, la preparación soluble de la envoltura externa de *Leptospira* era un medio útil para detectar anticuerpos antileptospirales. Se observó que uno de los componentes de la envoltura externa era un antígeno específico para la fijación de complemento, mientras que en la prueba de la inhibición de la hemaglutinación, se encontró otro componente que reaccionaba ampliamente y era específico de género. Este último componente fue detectado principalmente por anticuerpos de inmunoglobulina M.*

### Introducción

Se conocen numerosas pruebas serológicas para detectar anticuerpos leptospirales. Las empleadas más comunmente son la aglutinación microscópica de referencia (1) que es sumamente sensible y específica de serotipo, y la prueba presuntiva, y menos sensible, de aglutinación en placa macroscópica (2). Ambos métodos requieren un gran número de antígenos que se preparan de suspensiones de distintos serotipos de *Leptospira*. Esto es necesario para abarcar el espectro antigénico de todos los serotipos leptospirales conocidos en un área determinada y puede limitar su valor como procedimientos selectivos. Otros métodos diagnósticos que han sido utilizados satisfactoriamente para infecciones humanas o animales por leptospiras son la lisis de eritrocitos sensibilizados (3, 4) o la hemaglutinación pasiva (5-7) y la fijación de com-

plemento (8, 9). En general, estas pruebas emplean un solo antígeno específico de género que se extrae de cepas de leptospiras acuáticas seleccionadas, tales como el serotipo *patoc* del grupo Semaranga. Pueden detectar anticuerpos en sueros, independientemente de los serotipos infectantes, y se consideran convenientes para descubrir la enfermedad en una fase más precoz que con las pruebas de aglutinación. Sin embargo, este tipo de antígeno es difícil de preparar y puede carecer de sensibilidad para detectar anticuerpos en sueros animales. Cuando las instalaciones de diagnóstico son limitadas y debe estudiarse un gran número de sueros en pruebas selectivas será de mayor valor el procedimiento más sensible y confiable utilizando un antígeno de fácil preparación.

Se ha demostrado que la envoltura externa de *Leptospira* es un poderoso inmunógeno en cricetos (10, 11). La presente investigación se emprendió para conocer el valor que tiene dicha envoltura en el estudio selectivo de sueros contra la leptospirosis mediante las pruebas de fijación de comple-

<sup>1</sup> Laboratorio de Leptospirosis, Centro Panamericano de Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud, Casilla de Correo 3092, Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina.

mento y hemaglutinación pasiva. Habida cuenta de otros estudios relacionados con brotes humanos y bovinos de leptospirosis ocurridos en Barbados, Indias Occidentales, estaban asociados con el serotipo *fort-bragg*, se utilizaron preparaciones de envolturas externas de dicho serotipo (12). Se trató también de determinar la clase de inmunoglobulina que participaba en las reacciones de fijación de complemento y hemaglutinación, y en qué medida eran aplicables las pruebas para la detección precoz de la enfermedad.

## Material y métodos

### *Crecimiento de leptospirosis y preparación de antígeno*

De una rata de Barbados se aisló *Leptospira interrogans*, serotipo *fort-bragg*, que se empleó para preparar el antígeno de la envoltura externa (EE) (12). Los organismos se reprodujeron en medio de cultivo tisular de Eagle (medio mínimo esencial, Gibco) que contenía fracción V de albúmina bovina (Pentex). El medio se preparó en la forma descrita por Finn y Jones (13), excepto que en lugar del oleato sódico, se empleó de polisorbato 80. El cultivo se desarrolló de un inóculo al 10% de células en fase estacionaria durante un período de 5 a 7 días a 30°C en volúmenes de un litro. Las leptospirosis se cosecharon vivas mediante centrifugación en una centrífuga Sorvall SS-1 a 15,000 x g durante 15 minutos, y se desechó el líquido sobrenadante. La EE se extrajo de acuerdo con los procedimientos de Auran *et al.* (10) y Bey *et al.* (11). El complejo de la envoltura externa de las leptospirosis se disoció con 100 ml de una solución 1 M de cloruro de sodio durante 45 minutos a la temperatura ambiente. Esta suspensión se centrifugó y la masa leptospiral volvió a suspenderse en 10 ml de agua destilada. La EE se solubilizó añadiendo 100 ml de sulfato de laurilo sódico

(Sigma) al 0.04% durante 10 minutos y el material celular insoluble se separó por centrifugación. El líquido opalescente que contenía la EE soluble se pasó entonces por un filtro de membrana de 0.45  $\mu$ g (Millipore Corp., Bedford, Mass.), se dializó en una cámara fría en agua destilada durante 48 horas y se liofilizó. Para utilizarlo como solución de reserva de antígeno para las pruebas serológicas, la EE liofilizada a muy baja temperatura se diluyó en suero fisiológico hasta obtener 500  $\mu$ g/ml y se almacenó a -25°C hasta que se necesitó.

### *Filtración en gel del antígeno de EE en Sephadex G-200*

Se pasaron 15 mg (peso seco) de la EE *fort-bragg* diluidos en 1.0 ml de suero fisiológico, por una columna G-200 Sephadex (2 x 90 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora con fosfatos 0.1 M (pH 7.0) en cloruro de sodio 0.15 M con 0.02% de azida sódica. La absorción del efluente a 280 nm se registró constantemente. Se recogieron fracciones de 2.5 ml de la columna y se probó cada una de ellas para determinar la presencia de actividad antigénica por las pruebas de fijación de complemento (FC) y hemaglutinación pasiva (HA).

### *Sueros*

Se prepararon en conejos sueros antileptospirales de los serotipos del grupo Autumnalis, incluido el serotipo *fort-bragg*, y serotipos representativos de los otros 18 serogrupos leptospirales. Se siguió el método de Galton *et al.* (14) utilizando cultivos semisólidos de Fletcher muertos por calor (56°C durante 10 minutos). Se extrajo sangre de los conejos mediante punción cardíaca, dos semanas después de la última inyección. Los antisueros se distribuyeron en pequeñas alícuotas y se liofilizaron o almacenaron

congelados a  $-25^{\circ}\text{C}$ . En las pruebas comparadas para obtener una indicación de la clase de inmunoglobulina de anticuerpo que intervenía en las pruebas serológicas, se trató el antisuero *fort-bragg* con volúmenes iguales de 2-mercaptoetanol 0.1 M (Eastman Kodak, Rochester, N.Y.) durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Otros dos conejos recibieron dos inyecciones intravenosas de 2.0 ml de un cultivo vivo del serotipo *fort-bragg* en los días primero y octavo. Se obtuvieron muestras de suero a diversos intervalos durante 56 días y se almacenaron a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta que se examinaron. Estos conejos no mostraron anticuerpos leptospirales antes de la inoculación en las pruebas de aglutinación microscópica (AM), FC y HA.

Se recibieron sueros de pacientes con cuadro febril del Hospital Queen Elizabeth de Barbados (Indias Occidentales). Dieciséis fueron pareados; sin embargo, no se dispuso de antecedentes en relación a la fase de la enfermedad en el momento de recoger las muestras. Los sueros testigo se obtuvieron de miembros del personal de este Centro o de sus familiares, todos ellos en buen estado de salud.

Todos los sueros para las pruebas de FC y HA se inactivaron a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Para la HA se añadieron a una décima parte del volumen de la masa de eritrocitos de carnero lavados para eliminar los anticuerpos heterófilos. Las pruebas de AM comparadas se llevaron a cabo utilizando una serie de cultivos leptospirales vivos de acuerdo con el procedimiento descrito por Galton *et al.* (14).

#### *Prueba de fijación de complemento*

La técnica empleada se basó en la descrita por Biberstein y McGowan (15). El antígeno de EE se tituló en presencia de complemento, y se seleccionó la dilución que mostró mayor sensibilidad hacia los sueros positivos, aun cuando ocurriese lisis completa con los sueros negativos. Con solución

salina amortiguadora con veronal (VBS), (pH 7.4) se prepararon diluciones dobles (1:10 a 1:20,480) de muestras de suero inactivado. Las mayores diluciones séricas que mostraron fijación completa se consideraron positivas, mientras que las que presentaron fijación parcial o lisis completa se consideraron negativas.

#### *Sensibilización de hematíes de carnero y hemaglutinación*

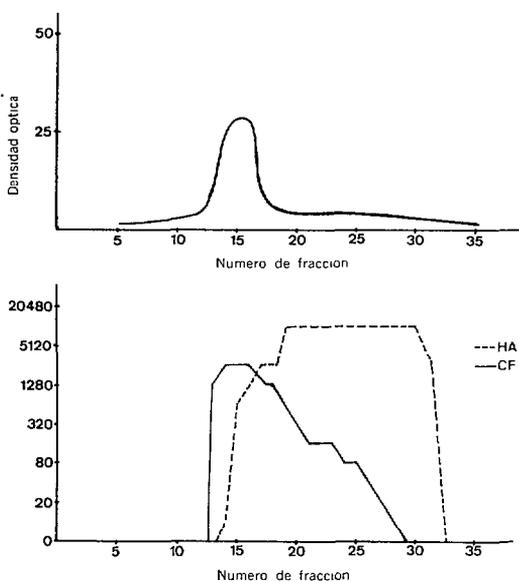
Se lavaron tres veces en VBS hematíes de carnero conservados en solución de Alserver. La masa de eritrocitos lavada se mezcló con un volumen igual de periodato potásico  $5 \times 10^{-4}$  M, en solución salina amortiguadora con fosfatos (pH 7.2) y se mantuvo a la temperatura ambiente durante 20 minutos, mezclándola ocasionalmente. Se preparó una suspensión al 10% por dilución de dichas células en VBS. La concentración óptima de antígeno necesaria para sensibilizar a los hematíes se determinó mediante una titulación convencional en bloque de antisuero de conejo homólogo en diluciones seriadas dobles (1:10 a 1:20,480) frente a la solución de reserva de antígeno (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) diluida en progresión aritmética por múltiplos de 5, de 1:5 hasta 1:50 en VBS. Un volumen al 10% de hematíes tratados se sensibilizó con 10 volúmenes de cada dilución de antígeno y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora, agitándolo de vez en cuando. Los hematíes sensibilizados se centrifugaron y se lavaron una vez y se volvieron a suspender al 1% para la prueba. La reacción de HA se efectuó, de acuerdo con Sulzer y Jones (7), en tubos de ensayo de  $12 \times 75$  mm, de fondo redondo, utilizando 0.4 ml de dilución sérica y 0.1 ml de hematíes sensibilizados. La mezcla se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas antes de realizar la lectura. La dilución óptima de antígeno para la sensibilización fue la mayor dilución de antisuero homólogo que formaba una fina red de

células sobre toda la superficie del fondo del tubo de ensayo. Se incluyeron también testigos de suero de conejo normal y células no sensibilizadas. Al examinar los sueros diagnósticos mediante la prueba de HA sólo se empleó la dilución óptima de antígeno de EE para sensibilizar a los hematíes.

## Resultados

De cada litro de cultivo de *L. fort-bragg* se obtuvo un promedio de 21.6 mg (peso seco) de antígeno de EE. En las titulaciones en bloque de la solución de reserva del antígeno que se efectuaron para determinar la dilución óptima para sensibilizar a los eritrocitos de carnero, se observó que las diluciones de antígeno de 1:20 a 1:30 daban el título de HA más alto (1:5,120) con el suero homólogo inmune. En las pruebas de HA subsiguientes se empleó sistemáticamente

FIGURA 1—Perfil de levigación en Sephadex G-200 de la envoltura externa soluble de *Leptospira interrogans*, serotipo *fort-bragg*, que muestra las fracciones activas de fijación de complemento y hemaglutinación en suero de conejo inmune a *fort-bragg*.



una dilución 1:20 de la solución de reserva del antígeno de EE para sensibilizar a los hematíes. En la titulación del antígeno con complemento en las pruebas de FC, los títulos máximos (1:2, 560) se obtuvieron cuando el antígeno se diluyó a 1:50.

En el cuadro 1 se presentan los resultados de la reactividad cruzada del antígeno de EE en las pruebas de FC y HA en comparación con los títulos obtenidos en la AM con antisueros inmunes de conejo homólogos y heterólogos. Las reacciones obtenidas en la AM o en la FC parecen ser más específicas con respecto a cepa o serogrupo, mientras que la reactividad cruzada de la HA con antisueros heterólogos es considerablemente mayor.

La filtración en gel de antígeno soluble de EE *fort-bragg* en una columna Sephadex G-200 permitió la separación de la actividad antigénica detectable para las pruebas de FC y HA (figura 1). En las pruebas de FC se utilizaron diluciones de antisuero homólogo de conejo por cada fracción del antígeno y los mayores títulos (1:2,560) se obtuvieron en las fracciones máximas ascendentes 14 a 16 de la columna. En las pruebas de HA la mayor actividad antigénica con títulos de 1:10,240 con el antisuero se obtuvieron inmediatamente después del máximo, en las fracciones 19 a 30.

Con el fin de obtener una indicación de la clase de inmunoglobulina que reaccionaba en las pruebas de FC y HA, se utilizaron la fracción 14 que se detectó principalmente en las pruebas de FC, y la fracción 30 que solo reaccionó en la HA, para examinar el antisuero homólogo antes y después del tratamiento con 2-mercaptoetanol. Estos resultados se presentan en el cuadro 2. En la FC con la fracción 14 de antígeno, el suero tratado con 2-mercaptoetanol solo produjo una reducción parcial del título, mientras que con la fracción 30 que no reaccionó en la prueba de FC, desaparecieron por completo los anticuerpos hemaglutinantes después del tratamiento con 2-mercaptoetanol. Estos resultados indican

CUADRO 1—Resultados comparados de los títulos<sup>a</sup> de las pruebas de fijación de complemento (FC), hemaglutinación (HA) y aglutinación microscópica (AM) en sueros de conejos inmunes a serotipos leptospirales del grupo Autumnalis y serotipos *Leptospira* representativos de otros 18 serogrupos.

Serogrupo	Antisueros <sup>b</sup> Serotipo	Título con antígeno de <i>L. fort-bragg</i> <sup>c</sup>			
		AM	FC	HA	
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	40,960	2,560	640	
	<i>rachmati</i>	40,960	640	1,280	
	<i>fort-bragg</i>	81,920	2,560	5,120	
	<i>sumatrana</i>	10,240	640	80	
	<i>bulgarica</i>	161,840	2,560	1,280	
	<i>banghinang</i>	40,960	640	160	
	<i>erinacei-aurti</i>	10,240	1,280	640	
	<i>morris</i>	40,960	640	640	
	<i>sentot</i>	5,120	160	640	
	<i>louisiana</i>	1,280	40	320	
	<i>orleans</i>	2,560	160	320	
	<i>djasiman</i>	320	40	160	
	<i>gurungi</i>	160	80	320	
	Canicola	<i>canicola</i>	80	40	640
	Pomona	<i>pomona</i>	40	80	1,280
Ictero-	<i>icterohaemorrhagiae</i>	—	80	80	
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	—	20	640	
Hebdomadis	<i>hardjo</i>	—	20	1,280	
Bataviae	<i>bataviae</i>	—	10	1,280	
Tarassovi	<i>tarassovi</i>	—	80	2,560	
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	320	320	640	
Javanica	<i>javanica</i>	—	10	640	
Celledoni	<i>celledoni</i>	—	—	640	
Ballum	<i>ballum</i>	—	—	320	
Cynopteri	<i>cynopteri</i>	40	10	20	
Australis	<i>australis</i>	40	320	80	
Panama	<i>panama</i>	—	20	1,280	
Shermani	<i>shermani</i>	—	20	640	
Andamana	<i>andamana</i>	—	—	640	
Semaranga	<i>semaranga</i>	—	—	160	
	<i>patoc</i>	—	—	160	
	<i>sao paulo</i>	—	—	80	
Ranarum	<i>ranarum</i>	80	—	80	

<sup>a</sup> Expresados como la recíproca de la dilución del suero; — indica menos de 50% de aglutinación a una dilución de suero de 1:10 en las pruebas de AM o fijación incompleta en las de FC.

<sup>b</sup> Los títulos homólogos oscilaron entre 1:6,400 y 1:204,800.

<sup>c</sup> La dilución de antígeno de EE para las pruebas de FC y HA se determinó mediante titulaciones en bloque con suero homólogo. En las pruebas de AM se emplearon organismos vivos.

que tanto los anticuerpos IgG e IgM intervienen en la prueba de FC y que solo estos últimos estarían implicados en la HA.

Con el fin de determinar la respuesta de inmunoglobulina después de la infección, se examinaron muestras de suero, obtenidas a diversos intervalos, de dos conejos inoculados previamente con leptospiras

*fort-bragg* vivas para determinar la presencia de anticuerpos en la AM, la FC y la HA (cuadro 3). Con la primera muestra de sangre obtenida ocho días después de la inoculación, los sueros de ambos conejos resultaron positivos con los tres métodos. Los anticuerpos de la HA fueron totalmente sensibles al 2-mercaptoetanol. De ma-

CUADRO 2—Resultados de las pruebas de fijación de complemento (FC) y hemaglutinación (HA) en suero de conejo inmune a *L. fort-bragg* tratado con 2-mercaptoetanol con antígeno de envoltura externa (EE) *fort-bragg* separado por filtración en gel en Sephadex G-200.

Antígeno de EE de <i>L. fort-bragg</i>	Títulos <sup>a</sup> de antisuero de <i>L. fort-bragg</i> con el antígeno indicado			
	FC		HA	
	Suero no tratado	2-mercaptoetanol <sup>b</sup>	Suero no tratado	2-mercaptoetanol
Entero	5,120	1,280	2,560	20
Sephadex G-200 fracción 14	2,560	1,280	10	0
Sephadex G-200 fracción 30	0	0	2,560	0

<sup>a</sup> Los títulos se expresan como la recíproca de la dilución del suero.

<sup>b</sup> El suero se trató con 2-mercaptoetanol a una concentración final de 0.1 M durante una hora a 37°C.

nera análoga, el tratamiento de los sueros con 2-mercaptoetanol redujo los títulos de la AM (de 1:10,240 y 1:20,480) a 1:160, y los de la FC (de 1:320 y 1:640) a 1:40. En los días 49 y 56 después de la inoculación los títulos de anticuerpos detectables en la HA se volvieron negativos, pero el tratamiento con 2-mercaptoetanol no afectó a los títulos de la AM y la FC, lo que

indica que solo el anticuerpo IgG estaba implicado.

En los cuadros 4 y 5 se presenta la correlación entre los títulos de las pruebas de AM, FC y HA en 83 sueros humanos de casos sospechosos de leptospirosis. De 37 sueros que mostraron en la AM aglutininas predominantes frente al serotipo *fort-bragg*, con títulos de 1:100 o mayores, 31 fueron

CUADRO 3—Actividad de anticuerpos en las pruebas de AM, FC y HA de sueros obtenidos a intervalos de dos conejos inoculados con *Leptospira*, serotipo *fort-bragg*, vivas.

Días después de la inoculación	Títulos <sup>a</sup> del suero con antígeno <i>L. fort-bragg</i>								
	AM			FC			HA		
	Conejo <sup>b</sup>		Media geomé- trica <sup>c</sup>	Conejo		Media geomé- trica	Conejo		Media geomé- trica
1	2	1		2	1		2		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	10,240	20,480	14,480	320	640	452	20	40	28
13	20,480	81,920	40,960	640	640	640	40	160	80
17	40,960	10,960	40,960	640	640	640	40	40	40
21	10,240	40,960	20,480	1,280	640	905	80	40	56
28	10,240	40,960	20,480	1,280	1,280	1,280	80	20	40
35	5,120	40,960	14,480	1,280	1,280	1,280	40	10	20
42	5,120	20,480	10,240	2,560	1,280	1,810	20	0	10
49	5,120	10,240	7,240	2,560	1,280	1,810	0	0	0
56	5,120	10,240	7,240	1,280	640	905	0	0	0

<sup>a</sup> Los títulos se expresan como la recíproca de la dilución del suero

<sup>b</sup> Los conejos fueron inoculados por vía intravenosa el día primero y octavo con 2.0 ml de un cultivo semisólido del serotipo *fort-bragg* de cinco días.

<sup>c</sup> Media geométrica de los valores obtenidos.

CUADRO 4—Comparación de los resultados obtenidos con 83 sueros de enfermos en las pruebas de aglutinación microscópica (AM), fijación de complemento (FC) y hemaglutinación pasiva (HA) para la detección de anticuerpos de *Leptospira*, serotipo *fort-bragg*.

Reacción a la AM	Reacción a la FC			Reacción a la HA		
	Positiva	Negativa	Total	Positiva	Negativa	Total
Positiva	31	6	37	25	12	37
Negativa	0	46	46	3	43	46
Total	31	52	83	28	55	83

también positivos en las pruebas de FC con títulos de 1:10 o mayores (sensibilidad para la FC 83.78%) y 25 fueron positivos con títulos de 1:10 o superiores en la prueba de HA (sensibilidad para la HA 67.56%). Otras tres muestras de suero que fueron negativas en las pruebas de AM y FC resultaron positivas en las pruebas de HA con títulos de 1:10 a 1:40. Cuando estos tres sueros, junto con otros cinco seleccionados

al azar que mostraron anticuerpos en la FC y la HA, se trataron con 2-mercaptoetanol y se examinaron de nuevo, había desaparecido toda la actividad hemaglutinante. Por otra parte, en los sueros que resultaron positivos en las pruebas de FC, los títulos obtenidos al repetir esta prueba, no fueron afectados por el 2-mercaptoetanol o fueron reducidos en una dilución sérica doble.

CUADRO 5—Correlación entre los títulos de anticuerpos contra *Leptospira*, serotipo *fort-bragg*, en los 83 sueros de enfermos examinados mediante la prueba de aglutinación microscópica (AM) con organismos vivos y las pruebas de fijación de complemento (FC) y hemaglutinación (HA) con antígeno de envoltura externa.

Títulos <sup>a</sup> de los sueros en las pruebas de AM	Títulos de los sueros en las pruebas de FC									
	0	10	20	40	80	160	320	640	1,210	o >
0 a 50	46									
100 a 200	4	1								
400 a 800	2	6	2	2						
1,600 a 3,200			3	1	4	1				
6,400 a 12,800				1		2	1	1		
25,600 o >							1	1		4

Títulos <sup>a</sup> de los sueros en las pruebas de AM	Títulos de los sueros en las pruebas de HA									
	0	10	20	40	80	160	320	640	1,280	o >
0 a 50	43	2		1						
100 a 200	3	1					1			
400 a 800	6	1	1	3		3				
1,600 a 3,200	2	1	1	1			1			1
6,400 a 12,800				2			1	1		1
25,600 o >	1			1	3	1				

<sup>a</sup> Los títulos se expresan como la recíproca de la dilución del suero.

Los sueros testigo de los 34 individuos sanos resultaron negativos con los tres métodos en lo que se refiere a anticuerpos leptospirales.

La extensa reactividad cruzada con serotipos heterólogos de la prueba de HA con el antígeno de EE quedó demostrada al examinar sueros pareados de una infección humana reciente causada por el serotipo *pomona*. A los tres días del comienzo de la enfermedad, cuando un cultivo sanguíneo para leptospirosis resultó positivo, se obtuvo un título de hemaglutinación de 1:10. Se observaron reacciones negativas con la prueba de FC y con la serie de serotipos leptospirales utilizados en el procedimiento de la AM. Transcurridos ocho días, se obtuvo en la HA un título de 1:1,280 con la segunda muestra. La prueba de FC se convirtió entonces en positiva con un título de 1:80, y el título de la AM frente al serotipo *pomona* fue de 1:800.

## Discusión

Las pruebas de FC y HA se han empleado extensamente para detectar anticuerpos leptospirales. En general, el antígeno utilizado ha consistido en sustancias específicas de género extraídas de leptospiras acuáticas. Algunos de los inconvenientes de dichas pruebas han sido las dificultades encontradas en la preparación y la estabilidad del antígeno y en la sensibilidad de la prueba.

En el presente estudio se empleó material de EE de *Leptospira*, serotipo *fort-bragg*, para sensibilizar a hematíes de carnero para la prueba de HA y como antígeno en la prueba de FC. El complejo de EE de leptospiras es un poderoso inmunógeno en cricetos (10, 11). Su localización anatómica como antígeno de superficie sugiere su intervención en la creación de anticuerpos en los comienzos de la enfermedad. El antígeno de EE es relativamente fácil de preparar, está presente en cantidades que hacen que

su uso resulte práctico para la ejecución sistemática de pruebas serológicas y, cuando se liofiliza o congela en estado líquido, es estable por lo menos durante un año.

El fraccionamiento del complejo de EE leptospiral en una columna Sephadex G-200 permitió la separación de dos componentes antigénicos. Uno de ellos reaccionó como antígeno de fijación de complemento y el otro como antígeno sensibilizador de eritrocitos.

El antígeno de EE que se utilizó en las pruebas de FC con sueros de conejos inmunizados contra leptospiras homólogas y heterólogas mostró gran especificidad de serotipo y reaccionó tanto con IgM como con IgG. En cambio en la HA las reacciones con hematíes sensibilizados con la EE fueron principalmente de reacción cruzada o específica de género. La supresión de la actividad en la HA mediante el tratamiento de los sueros con 2-mercaptoetanol indica que esa prueba solo detecta anticuerpos IgM. Estos resultados concuerdan con los de otros autores (6, 7). Sulzer y Jones (7) formularon la hipótesis de que los anticuerpos IgM aparecen antes que los IgG en las infecciones por leptospiras. Los resultados obtenidos en el presente estudio con conejos corroboran también esta opinión. Las muestras de suero que se obtuvieron a los ocho días de la inoculación con leptospiras vivas mostraron que la primera respuesta serológica se debía principalmente a anticuerpos sensibles al 2-mercaptoetanol. Transcurridos 49 y 56 días, cuando las pruebas de HA dieron resultados negativos, las reacciones positivas en la AM y la FC solo se debieron a anticuerpos resistentes al 2-mercaptoetanol.

Las pruebas de AM, FC y HA con sueros humanos de casos sospechosos de leptospirosis mostraron una correlación bastante buena en cuanto a sensibilidad, además de una alta especificidad. En los casos en que las instalaciones de laboratorio sean muy limitadas para examinar sueros mediante la

prueba de AM, la prueba de FC con el antígeno de EE leptospiral ofrecería un método útil para examinar sueros humanos sospechosos de leptospirosis, siempre que se conozcan los serotipos infectantes. Por otro lado, la prueba de HA, por su amplia reactividad cruzada con todas las leptospiras, sería también valiosa para examinar sueros humanos independientemente del serotipo infectante y, además, ofrecería la ventaja de detectar anticuerpos precoces. Convendría realizar otros estudios comparados utilizando sueros obtenidos durante la fase aguda y de convalecencia de la enfermedad.

Los ensayos preliminares realizados con sueros sospechosos de leptospirosis bovina del ganado de Barbados sugieren que la prueba de HA sería también un instrumento útil para detectar infecciones en curso, pero se requieren aún nuevos estudios.

## Resumen

Se evaluaron antígenos de la envoltura externa de leptospiras preparados con *Leptospira*, serotipo *fort-bragg*, para las pruebas de fijación de complemento y hemaglutinación pasiva con el fin de detectar anticuerpos séricos antileptospirales. La reactividad serológica de la preparación de la envoltura externa se examinó en comparación con sueros humanos sospechosos de leptospirosis y antisueros de conejo inmunes homólogos

y heterólogos. Las pruebas de fijación de complemento y hemaglutinación fueron lo suficientemente sensibles para detectar anticuerpos leptospirales cuando se compararon con la prueba estándar de aglutinación microscópica.

El fraccionamiento del complejo de la envoltura externa en una columna Sephadex G-200 permitió la separación de dos componentes antigénicos: un antígeno de fijación de complemento que mostró características específicas de serotipo, y un sensibilizador de eritrocitos, específico de serogrupo.

Los resultados del tratamiento de sueros de conejo inmunes con 2-mercaptoetanol revelaron que la reacción inmunológica que se detectó en las pruebas de aglutinación microscópica y fijación de complemento se debía tanto a anticuerpos IgM como a IgG. En la prueba de hemaglutinación los resultados sugirieron que solo intervienen en la reacción anticuerpos IgM.

La preparación de envoltura externa que se utilizó como antígeno en las pruebas de fijación de complemento parece apropiada para el examen de sueros humanos sospechosos de leptospirosis cuando se conocen los serotipos infectantes. Se sugiere que el empleo de este antígeno en las pruebas de hemaglutinación puede aplicarse al examen de sueros, independientemente de la cepa infectante, basándose en la reactividad cruzada que se observó entre los diferentes serotipos. Además, se pueden detectar infecciones con más precocidad que por medio de las pruebas de aglutinación. □

## REFERENCIAS

- (1) Schuffner, W. y A. Mochtar. Versuche zur Aufteilung von leptospirenstämmen, mit einleitender bemerkungen über den verlauf von agglutination und lysis. *Zibl Bakt I Orig* 101:405-413, 1927.
- (2) Galton, M. M., D. K. Powers, A. D. Hale y R. Cornell. A rapid macroscopic slide screening tests for the serodiagnosis of leptospirosis. *Am J Vet Res* 19:505-512, 1958.
- (3) Chang, R. S., D. J. Smith, D. E. McComb, C. F. Sharp y J. I. Teng. The use of erythrocyte sensitizing substance in the diagnosis of leptospirosis. *Am J Trop Med* 6:101-107, 1957.
- (4) Cox, C. D. Hemolysis of sheep erythrocytes

- sensitized with leptospiral extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 90:610-615, 1955.
- (5) Umanura, S., H. Matsui y Y. Askizawa. Studies on indirect hemagglutination test for leptospirosis. *Jpn J Exp Med* 42:563-568, 1972.
- (6) Palit, A. y J. Gulasekharan. Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J Clin Pathol* 26:7-16, 1973.
- (7) Sulzer, C. R. y W. L. Jones. Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Appl Environ Microbiol* 26:655-657, 1973.
- (8) Ezell, S. B., W. G. Hoag, A. R. Warner, R. H. Yager y W.S. Gochenour. Soluble specific leptospiral complement-fixing antigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 80:220-223, 1952.
- (9) Turner, L. H. Leptospirosis. II. Serology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 62:880-899, 1968.
- (10) Auran, N. E., R. C. Johnson y D. M. Ritzi. Isolation of the outer sheath of *Leptospira* and its immunologic properties in hamsters. *Infect Immun* 5:968-975, 1972.
- (11) Bey, R. F., N. E. Auran y R. C. Johnson. Immunogenicity of whole-cell and outer envelope leptospiral vaccines in hamster. *Infect Immun* 10:1051-1056, 1974.
- (12) Myers, D. M. y C. J. Jones. Aislamiento de *Leptospira fort-bragg* de una rata de Barbados. *Bol Of Sanit Panam* 80(3):254-257, 1976.
- (13) Finn, M. A. y R. H. Jones. Growth of saprophytic and pathogenic *Leptospira*: Evaluation of medium, temperature, inoculum, and cost. *Appl Environ Microbiol* 31:134-137, 1976.
- (14) Galton, M. M., R. W. Menges, E. B. Shotts, A. J. Nahmias y C. W. Heath. *Leptospirosis: Epidemiology, Clinical Manifestations in Man and Animals, and Methods in Laboratory Diagnosis*. U.S. Public Health Service, Washington, D.C., 1962 (U.S.P.H.S. Publication No. 951.)
- (15) Biberstein, E. L. y B. McGowan. Epididymitis in rams, studies on laboratory diagnosis. *Cornell Vet J* 48:31-44, 1958.

#### Evaluation of the outer envelope antigens of *Leptospira* in complement fixation tests for leptospirosis (Summary)

The leptospiral outer envelope antigens prepared from *Leptospira* serotype *fort-bragg* were evaluated for complement fixation and passive hemagglutination tests to detect antileptospiral serum antibody. The serological reactivity of the outer envelope preparation was examined against sera from humans suspected of having leptospirosis and homologous and heterologous immune rabbit antisera. The complement fixation and hemagglutination tests appeared to be sufficiently sensitive for detecting leptospiral antibody when compared to the standard microscopic agglutination test.

Fractionation of the outer envelope complex on a column of Sephadex G-200 permitted the separation of two antigenic components, one was a complement-fixing antigen showing serotype-specific characteristics, whereas the other was erythrocyte-sensitizing and serogroup-

specific.

Results of 2-mercaptoethanol treatment of immune rabbit sera revealed that the immunological response detected in microscopic agglutination and complement fixation tests was due to both IgM and IgG. In the hemagglutination test, the findings suggested that only IgM antibodies are involved in the reaction.

The outer envelope preparation used as antigen in complement fixation tests seems suitable for screening human sera for leptospirosis where the infecting serotypes are known. It is suggested that the use of this antigen in hemagglutination tests is applicable for the screening of sera irrespective of the infecting strain on the basis of its observed cross-reactivity among the different serotypes. Furthermore, it may detect infections earlier than agglutination tests.

#### Avaliação de antígenos da capa externa de *Leptospira* nas provas de fixação do complemento e da hemaglutinação para a leptospirose (Resumo)

Avaliaram-se antígenos da capa externa de leptospirosas preparados com *Leptospira*, serotipo *fort-bragg*, para as provas de fixação de com-

plemento de hemaglutinação passiva com o fim de detectar anticorpos séricos antileptospirais. A reatividade serológica da preparação da capa

externa foi examinada em comparação com soros humanos suspeitos de leptospirose e antisoros de coelho imunes homologos e heterólogos. As provas de fixação de complemento e hemaglutinação foram suficientemente sensíveis para detectar anticorpos leptospirais quando se compararam com a prova standard de aglutinação microscópica.

O fracionamento do complexo da capa externa numa coluna Sephadex G-200 permitiu a separação de dois componentes antigênicos: um antígeno de fixação de complemento que demonstrou características específicas de serotipo, e um sensibilizador de eritrócitos, específico de serogrupo.

Os resultados do tratamento de soros de coelhos imunes com 2-Mercaptoetanol revelaram que a reação imunológica que se detectou nas

provas de aglutinação microscópica e fixação de complemento se devia tanto aos anticorpos IgM como aos IgG. Na prova de hemaglutinação os resultados sugeriram que somente intervêm na reação, anticorpos IgM.

A preparação da capa externa que se utilizou como antígeno nas provas de fixação de complemento parece apropriada para o exame de soros humanos suspeitos de leptospirose quando se conhecem os serotipos infectantes. Sugere-se que o emprego deste antígeno nas provas de hemaglutinação pode ser aplicado no exame de soros independentemente da cepa infectante, baseando-se na reatividade cruzada que se observou entre os vários serotipos. Além disso, podem assim se detectar infecções muito mais cedo que mediante as provas de aglutinação.

#### Evaluation d'antigènes de l'enveloppe externe de *Leptospira* dans les tests de fixation de complément et d'hémagglutination pour la leptospirose (Résumé)

Il a été procédé à une évaluation des antigènes de l'enveloppe externe de leptospires préparés avec *Leptospira*, sérotype *fort-bragg*, pour les tests de fixation de complément et d'hémagglutination passive visant à la détection d'anticorps sériques antileptospiraux. La réactivité sérologique de la préparation de l'enveloppe externe a été étudiée par comparaison avec des sérums humains suspects de leptospirose et des antisérums de lapins immunisés homologues et hétérologues. Les tests de fixation de complément et d'hémagglutination ont, comparativement au test standard d'agglutination microscopique, démontré être suffisamment sensibles pour permettre la détection d'anticorps leptospiraux.

Le fractionnement du complexe de l'enveloppe externe dans une colonne Sephadex G-200 a permis de séparer deux composants antigéniques: un antigène de fixation d'alexine qui a démontré posséder des caractéristiques spécifiques de sérotype, et un antigène sensibilisateur d'érythrocytes, spécifique de sérogrupe.

Les résultats du traitement au 2-mercaptoéthanol de sérums de lapins immunisés ont démontré que la réaction immunologique décelée dans les tests d'agglutination microscopique et de fixation de complément était due à des anticorps IgM et IgG. Quant aux résultats de l'épreuve d'hémagglutination ils ont indiqué que seuls les anticorps IgM intervenaient dans la réaction.

La préparation d'enveloppe externe qui a été utilisée en tant qu'antigène dans les tests de fixation de complément semble convenir à l'examen de sérums humains suspects de leptospirose lorsque les sérotypes infectant sont connus.

Vu la réactivité croisée de cet antigène entre les divers sérotypes, il semble qu'on puisse l'employer dans les tests d'hémagglutination pour l'examen des sérums, quelle que soit la souche infectante. En outre, il pourrait permettre de détecter plus rapidement les infections que les tests d'agglutination.