

Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de componentes extracelulares de *Leptospira interrogans* serovar *canícola*

Yoandra Rodríguez, Marta González, Mariela Naranjo, Irma González, Reynaldo Oliva, Mildrey Fariñas

Instituto Finlay, Investigación - Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

Se desarrolló un cultivo de *Leptospira interrogans* serovar *canícola* en medio libre de proteínas a 28 °C durante 7 días, a partir del cual se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 25 000 g. Este, luego de concentrado por ultrafiltración, fue pasado por una columna de exclusión molecular utilizando una matriz de Sephacril S-300 y un sistema tampón fosfato salino con 0,01% de NaCl, pH 7,2. Las fracciones obtenidas fueron reconcentradas y se les determinó la concentración de las proteínas según Lowry. El poder inmunogénico se evaluó mediante inoculación intraperitoneal en ratones Balb/c de 50 µg de estas fracciones con posterior evaluación de la respuesta humoral mediante el test de microaglutinación. Se realizó además un experimento de protección en hámsters, los cuales fueron inmunizados con una preparación que contenía 50 µg de las fracciones obtenidas y confrontados posteriormente contra 10 000 DL₅₀ de tres cepas altamente virulentas de los serovares *canícola*, *copenhageni* y *mozdok*. Los resultados obtenidos mostraron, según el perfil cromatográfico, tres fracciones proteicas, de las cuales sólo la fracción de mayor peso molecular resultó ser inductora de anticuerpos aglutinantes tanto en ratones como en hámsters con títulos de 1:1240 y 1:360 respectivamente. Por otro lado esta fracción fue capaz de proteger a los hámsters inmunizados frente a 10 000 DL₅₀ de la cepa del serovar *canícola*, no así frente a *copenhageni* y *mozdok*, resultado que nos habla de protección serovar específica. Estos resultados nos permiten inferir que *L. canícola* produce al menos un antígeno o complejo antigénico soluble de importantes propiedades inmunogénicas y protectoras lo que avala su posible inclusión en una preparación vacunal de nueva generación.

Palabras claves: *Leptospira interrogans*, fracciones extracelulares, inmunogenicidad

Introducción

Existen numerosos reportes acerca del desarrollo de vacunas antileptospirósicas monovalentes, bivalentes y polivalentes (1-6). Sin embargo las disponibles hasta el momento confieren corta inmunidad y no proveen protección cruzada contra muchos de los serovares de *Leptospira interrogans* (3,5,7,10). La gran mayoría de ellas consisten en células completas inactivadas por diferentes métodos físicos o químicos. Por este motivo muy poco se ha reportado acerca de las posibles propiedades inmunogénicas de antígenos solubles de *Leptospira* presentes en el sobrenadante de cultivos, los cuales son separados durante el proceso de centrifugación de dichas bacterinas (11-13). Se conoce que las cepas de leptospira producen determinadas proteínas extracelulares tales como fosfolipasas, hialuronidasas y hemolisinas, las cuales pueden constituir importantes inmunógenos debido a su participación directa en la patogenia del microorganismo (14 -19).

Es por ello que nos dimos a la tarea de evaluar si tales componentes extracelulares de un cultivo de *Leptospira* eran capaces de inducir una respuesta de anticuerpos apreciable que mostrara reactividad ante las células completas y confiriera protección ante una infección experimental con *Leptospira* patógena, de forma tal que pudiera sugerirse su inclusión en una preparación vacunal como medida profiláctica contra la Leptospirosis.

Material y Método

Preparación del cultivo y obtención del sobrenadante. Se escogió una cepa de *L. interrogans* serovar *canícola*, la cual fue cultivada en medio libre de proteínas (20) a 28 °C durante 7 días en zaranda orbital, hasta alcanzar una concentración de $3,5 \times 10^8$ células/mL. Luego el cultivo se centrifugó a 25 000 g durante 30 min a 4 °C, en una centrífuga refrigerada (Beckman J2-21). El sobrenadante fue separado y concentrado 10 veces por ultrafiltración (Amicón). Finalmente se conservó a 4°C hasta su utilización.

Cromatografía. Al sobrenadante concentrado se le realizó cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de 1,6 x 98 cm y una matriz de Sephacril S-300 (Pharmacia Fine Chemicals). La cromatografía se desarrolló a una velocidad de flujo de 15 mL/h, empleando como tampón de corrida Fosfato de Sodio 0,01 M con 0,1% (p/v) de NaCl (pH 7,4). Fueron aplicados 3 mL de muestra en cada corrida. La cromatografía fue monitoreada por lectura de la densidad óptica a 280 nm (Uvicord 2238, LKB). Se colectaron fracciones de 4 mL y aquellas que se correspondían con los picos registrados en el cromatograma fueron mezcladas, reconcentradas y conservadas a 4°C. La concentración de las proteínas de cada fracción se determinó según el método de Lowry (21).

Procedimiento de inmunización en ratones. Se emplearon 250 ratones Balb/c de 18-22 g de peso corporal al inicio del experimento (CENPALAB, Cuba). Estos se dividieron en 5 grupos de 50 ratones cada uno. Tres de ellos fueron inmunizados por vía intraperitoneal (IP) con 50 μ g de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía, uno con células vivas de *L. canicola* por igual vía (control positivo) y el restante no recibió tratamiento (control negativo). Los animales se desangraron a los 21 días, la sangre fue mezclada por grupo y centrifugada a 6000 g durante 10 min para la obtención del suero, el cual se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Evaluación de la respuesta humoral. La respuesta de anticuerpos inducida en los ratones inmunizados se evaluó por la técnica de Microaglutinación (MAT) descrita por Myers (22), realizando diluciones dobles seriadas de los sueros desde 1:20 hasta 1:10240 en tampón fosfato salino (TFS) como diluyente. Como antígeno se utilizaron células vivas de *L. canicola* ajustadas a una concentración de 100×10^6 células/mL y como control positivo se consideró el suero de ratón anti-*L. canicola*. El título de aglutininas se expresó como el recíproco de la mayor dilución a la que se aglutinó el 50% de las células.

Experimento de protección en hámsters. Se emplearon 60 hámsters Sirio Dorado de 40-60 g de peso corporal al inicio del experimento (CENPALAB, Cuba) divididos en grupos de 5 animales cada uno. Cuarenta y cinco hámsters fueron inmunizados por vía intramuscular (IM) con 0,5 mL de una preparación que contenía: 50 μ g de cada fracción obtenida en la cromatografía (15 hámsters por fracción), 1 mg de hidróxido de aluminio como adyuvante, TFS como diluyente y Tiomersal al 0,01% como preservante. Los restantes fueron inoculados con el placebo (gel de hidróxido de aluminio, TFS y Tiomersal en las mismas concentraciones), sirviendo como controles del experimento. A los 14 días post inmunización los animales fueron retados por vía IP con 10 000 DL₅₀ de cepas altamente virulentas de *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok* (5 hámsters inmunizados con cada fracción y 5 controles por serovar). Para el reto se determinó la concentración de leptospira mediante conteo en cámara de Petroff Hauser, y definida la DL50 mediante el método de Reed y Muench (23). Posterior al reto los animales fueron observados durante 14 días. Se realizaron extracciones de sangre antes de la inmunización, 14 días post inmunización (antes del reto) y 14 días post reto para evaluación de los sueros por MAT como se describió previamente.

Resultados

Cromatografía. Mediante el método cromatográfico empleado se obtuvieron tres fracciones fundamentales,

que se correspondían con los picos máximos de absorbancia (Figura 1).

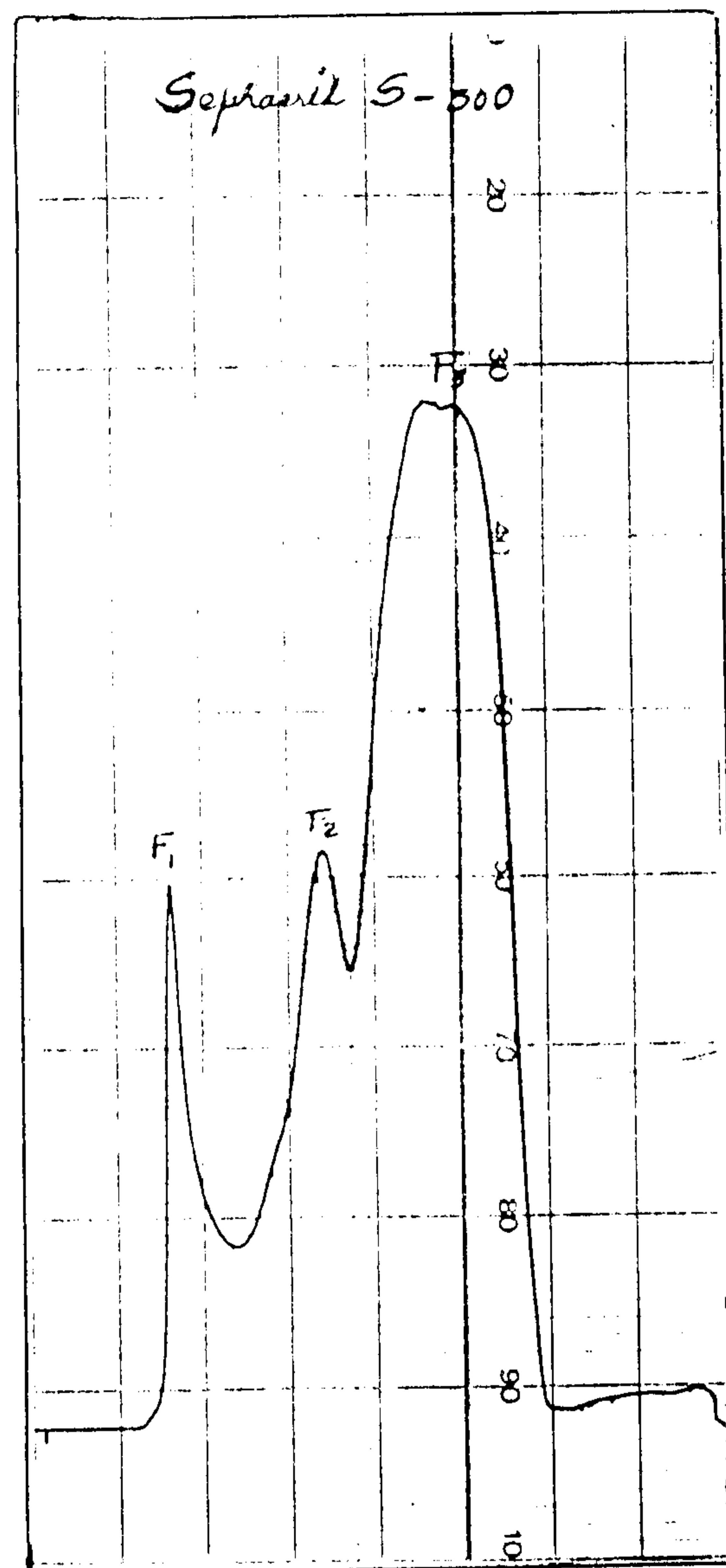


Figura 1. Resultados de la cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante concentrado, obtenido a partir del cultivo de *L. canicola*. Se utilizó una columna de 1,6 x 98 cm y una matriz de Sepharil S-300. Velocidad de flujo de 15 mL/h y tampón de corrida Fosfato de Sodio 0,01 M con 0,1% (p/v) de NaCl (pH= 7,4). F1, F2 y F3 se refieren a las fracciones colectadas, las que se corresponden con los principales picos de absorbancia a 280 nm.

Respuesta humoral en ratones. La respuesta humoral en ratones inoculados con las proteínas extracelulares fue evaluada por MAT. En el grupo inoculado con la fracción F1 se observó un título de anticuerpos de 1:1280, así como un título de 1: 2560 en el grupo control positivo. Sin embargo en los restantes grupos no se observó respuesta de anticuerpos aglutinantes (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del ensayo de Microaglutinación frente a antígeno celular de *L. canicola* empleando sueros de ratones inmunizados con las diferentes fracciones

Inmunizado	Título preinoculación	Título 14 días postinoculación
Fracción I	0	1:1280
Fracción II	0	0
Fracción III	0	0
Células vivas de <i>L. canicola</i>	0	1:2560
Control neg.	0	0

Experimento de protección en hámsters. El estado inmune de los hámsters vacunados con 50 µg de proteínas de cada una de las fracciones fue evaluado mediante reto frente a los serovares *Leptospira interrogans* antes descritos. El 100% de los hámsters inmunizados con la fracción F1 sobrevivieron al reto frente a 10 000 DL₅₀ de la cepa del serovar *canicola*, no así frente a *copenhageni* y *mozdok*, las que provocaron un 100% de mortalidad. Por su parte en los hámsters inoculados con las demás fracciones, así como el grupo control, hubo un 100% de mortalidad (Tabla 2). En todos los animales que contrajeron la enfermedad se observaron lesiones típicas de Leptospirosis, a diferencia de los que resultaron protegidos donde sólo apareció un proceso granulomatoso localizado a nivel de la zona de inoculación del preparado debido al efecto del hidróxido de aluminio empleado como adyuvante. En los animales inoculados con la fracción F1 hubo respuesta de anticuerpos aglutinantes frente a *L. canicola*, observándose en aquellos que sobrevivieron al reto títulos de anticuerpos aglutinantes que aumentaron desde 1:320 antes del reto a 1:2560 después del reto. No se observó respuesta de anticuerpos aglutinantes en los hámsters inoculados con las demás fracciones. (Datos no mostrados).

Tabla 2. Resultados de la confrontación contra 10 000 DL 50 de cepas de *L. interrogans* altamente virulentas en hámsters vacunados y controles

Serovar de reto	Hámster vacunados (sobrevivientes/total)			Controles (no vacunados)
	Fracción I	Fracción II	Fracción III	
<i>L. canicola</i>	5/5	0/5	0/5	0/5
<i>L. copenhageni</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>L. mozdok</i>	0/5	0/5	0/5	0/5

Discusión

Los medios proteicos han sido ampliamente usados para el cultivo de *Leptospira*. Para el uso de los mismos en la preparación de las bacterinas convencionales los componentes proteicos del medio deben ser removidos

para evitar las reacciones anafilácticas en los animales vacunados. Con la centrifugación también son separados los antígenos solubles perdiéndose de esta forma posibles componentes inmunogénicos importantes.

Los resultados del presente trabajo mostraron que *L. canicola* produce una fracción soluble de alto peso molecular, capaz de inducir anticuerpos aglutinantes tanto en ratones como en hámsters con un título de 1:1280 y 1:320 respectivamente. Resulta interesante que anticuerpos inducidos contra antígenos solubles del microorganismo, presentes en el medio de cultivo, sean capaces de aglutinar las células, puesto que ello demuestra que estos anticuerpos no sólo reconocen determinantes antigénicos presentes en las proteínas secretadas, sino también aquellos localizados en la superficie celular, sitio donde se lleva a cabo la reacción de microaglutinación. Este hecho puede deberse a la presencia de determinantes antigénicos comunes o similares entre componentes de membrana y la fracción soluble, a que los antígenos solubles se deriven de proteínas de la membrana externa, o a que estos antígenos provengan del interior y que transitoriamente se encuentren en superficie.

El estudio de protección en hámsters arrojó también resultados interesantes, puesto que sólo en el grupo inmunizado con 50 µg de la fracción F1 hubo un 100% de sobrevivencia frente al reto con 10 000 DL₅₀ de la cepa de *L. canicola* altamente virulenta, lo cual nos indica que el o los componentes protectores se encuentran localizados en esta fracción.

Existen en la literatura reportes similares acerca de la potencialidad inmunogénica de componentes solubles de *L. interrogans* (23-27). Schricker y Hausan (24) prepararon una fracción serológicamente activa a partir de un cultivo de *L. pomona* luego de separar las células, la cual contenía 5 precipitógenos. Horg y Bell (25) extrajeron un antígeno soluble de *L. pomona* el cual mostró buena protección en terneros. Enzue y col. (26) demostraron la presencia de un antígeno o complejo antigénico en el sobrenadante de cultivos de varios serovares de *L. interrogans*.

Hussein y col. (27) demuestran que una bacterina bivalente (*canicola* e *icterohaemorrhagiae*), preparada a partir de un cultivo completo ofrece mayor protección en hámsters en comparación con la preparada a partir del material celular solamente, lo que les conduce a plantear que *L. icterohaemorrhagiae* y *L. canicola* produce al menos un antígeno soluble o complejo antigénico de potentes propiedades inmunogénicas. Nuestros resultados apoyan el planteamiento de estos autores, puesto que se demostró mediante el test de microaglutinación y la prueba de potencia en hámsters que en la fracción extracelular obtenida existe al menos un componente altamente inmunogénico y protector.

Sin embargo, el ensayo de potencia en hámsters mostró que, con la dosis de reto empleada, esta fracción soluble fue capaz de conferir protección serovar específica, es decir sólo hubo protección para el serovar *canícola*, a partir del cual obtuvo dicha fracción, en comparación con un 100% de mortalidad en los animales retados contra *L. copenhageni* y *L. mozdok*. En ello coincidimos con los reportes de numerosos autores acerca de que la protección es específica a los serovares implicados en la preparación vacunal (3,8,9,12), al menos usando este tipo de preparación. No obstante no se descarta la posibilidad de que empleando dosis de reto menores pueda evidenciarse cierta protección cruzada frente a

estos serovares en los animales inoculados con la fracción obtenida, lo cual será objeto de estudio en evaluaciones posteriores.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la presencia de antígenos solubles con fuerte capacidad inmunogénica y protectora. No obstante, es necesario la realización de otros estudios relacionados con la naturaleza, cantidad y calidad de estos antígenos para diferentes serovares, así como la búsqueda, si existieran, de antígenos protectores comunes a diferentes serovares, lo cual podría avalar su inclusión en preparados de nueva generación.

Referencias

1. Bolin CA, Cassells JA, Zuerner RL, Trueba G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* vaccine on type *hardjo-bovis* infection of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52(10):1639-43.
2. Jost BH, Adler B, Faine S. Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. *J. Med. Microbiol.* 1989; 29:115-20.
3. Mazusawa T, Suzuki R, Yanagihara Y. Comparison of protective effects of tetravalent glycolipid antigen and whole cell-inactivated vaccine in experimental infection of leptospires. *Microbiol. Immunol.* 1991; 35(3):119-208.
4. Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived conjugates from *Leptospira interrogans*. *J. Med. Microbiol.* 1990; 33(3):199-204.
5. Russel FB, Russel CJ. Immunogenicity and humoral and cell-mediated immune response to leptospira whole cell, outer envelope and protoplasmic cylinder vaccines in hamsters and dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1982; 43(5):1109-1113.
6. Russel FB, Russel CJ. Current status of leptospiral vaccines. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* 1986; 2:175-97.
7. Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. WHO. Geneva; (off set. publication No 67).
8. WHO. Report of the discussion of the WHO working group on *Leptospira* vaccine development and vaccinology. Geneva; 1993.
9. Zhao H, Yau R, Dai R. Investigation of the immunoprotection of monoclonal antibodies against outer envelope of the serogroup *Icterohaemorrhagiae* serovar *lai* strain O17 leptospires. *Hua. Hs. J. Ko. Ta. Hsuch. Pao.* 1990; 21(3):239-41.
10. Chapman AJ, Adler B, Faine S. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J. Medical. Microbiol.* 1988; 25:269-78.
11. Shenberg E, Torten MA. A new leptospiral vaccine. Development of a vaccine from *Leptospira* grown in a chemically defined medium. *J Infect. Dis.* 1973; 12:642-646.
12. Ting-Zuo C. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann. Immunol. Hung.* 1986; 26:125-151.
13. Nunes-Edwards PL, Thierman AB, Bassford JR. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* during in vitro cultivation. *Infect. Immunol.* 1991; 59(30):1131-1140.
14. Dain AA, Rozinov MN, Holzmayer TA, Gershanovich N. Cloning and expression of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* hemolysin gene in *Escherichia coli*. *Zl. Mikrob. Epidem. Immun.* 1985; 7:7-10.
15. Perolat P, Baranton G. *Leptospira interrogans* et la leptospirase. *Bell. Inst. Pasteur.* 1990; 88:315-318.
16. Bernheimer AW, Bey RF. Copurification of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* hemolysin and sphingomyelinase C. *Infect Immun.* 1986; 54: 262-64.
17. Thompson JC. Morphological changes in red blood cells of calves caused by *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. *J. Infect. Dis.* 1986; 96(5):517-27.
18. Volina EG, Levina LF, Soboleva GL. Phospholipase activity and virulence of pathogenic leptospires. *J. Hyg. Epidemiol.* 1986; 30:163-169.
19. Yanagihara Y, Kojima T, Mifuchi Y. Haemolytic activity of *Leptospira interrogans* serovar *canícola* in a protein-free medium. *Microbiol Immunol.* 1982; 26:547.
20. Shenberg E. Grow of pathogenic leptospires in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 1977; 93(5):1598-1606.
21. Lowry OH. Protein measurement with the folin fenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265.
22. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27:493-497.
23. Stamlheim OHV, Wilsom JB. Antigenicity and immunogenicity of leptospires grown in a chemical characterization medium. *Am. J. Vet. Res.* 1988; 25:1277-1280.
24. Schrickler RL, Hanson LE. Precipitating antigens of leptospires. I. Chemical properties and serological activity of soluble fractions of *Leptospira pomona*. *Am. J. Vet. Res.* 1963; 24:854-860.
25. Hoag WG, Bell WB. An immunogenic agent for the protection of cattle against *Leptospira pomona*. *Am. J. Vet. Res.* 1955; 16:381-385.
26. Enzell, SB, et al. Soluble specific leptospira complement-fixing antigens. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* 1952; 80:220-223.
27. Morsi MH, Shibley PG. Cellular and whole-culture bivalent leptospiral bacterins: safety and potency in guinea pigs and hamsters. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34(1):115-117.

Evaluation of the immunogenic and protective properties of the extracellular components of the *Leptospira interrogans* serovar *canicola*

Abstract

The immunogenic properties of extracellular components of *Leptospira interrogans* serovar *canicola* were evaluated in mice and hamsters. A virulent strain of this serovar was cultivated in a protein-free medium for 7 days at 28 °C. The supernatant was obtained by centrifugation at 25 000 g, concentrated by ultra-filtration and purified by means chromatography on a column of Sephacryll S-300 gel. 50 µg of the obtained fractions were inoculated in mice and the levels of agglutinins against the above serovar were determined by microscopic agglutination test. On the other hand, the induction of protective antibodies was evaluated by a potency test in hamsters. Hamsters were vaccinated with these fractions and then challenged against 10000 DL₅₀ of *L. interrogans* serovars *canicola*, *copenhageni* and *mozdok*. The results showed, according to the chromatographic profile, three main fractions, but only one rose a considerable antibody response in mice and protected 100% of hamsters against *L. canicola* challenge. However, all vaccinated did not survive to *L. copenhageni* and *L. mozdok* exposure, therefore the protection was serovar specific. These results demonstrated that at least one soluble antigen or antigen complex of strong immunogenic and protective properties is produced in cultures of *L. canicola*.

Key words: *Leptospira interrogans*, extracellular fractions, immunogenicity