

Estudio comparativo de la capacidad inmunogénica y protectogénica en hámsters de variantes de vacuna adsorbida y no adsorbida contra la leptospirosis

✉ Marta González¹, Irma González¹, Niurka Batista¹, Yoandra Rodríguez¹, Juan F Infante², Reynaldo Oliva², Arturo Talavera³, Gustavo Sierra³

Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros, Instituto Finlay
Ave. 27 No. 19805, La Lisa, AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: 53(7)336075; E-mail: martaglez@finlay.edu.cu

¹ Laboratorio de Leptospira. Vicepresidencia de Investigaciones

² División de Modelos Experimentales y Patología. Vicepresidencia de Desarrollo

³ Dirección Técnica de Proyectos, Vicepresidencia de Investigaciones

RESUMEN

Se formularon dos variantes de vacuna de células inactivadas contra la leptospirosis humana: no adsorbida (VNA) y adsorbida en hidróxido de aluminio (VA), empleando cepas autóctonas de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*. Estas contenían de 50 a 80 x10⁶ células por serovar por dosis de 0.5 mL. La inmunogenicidad y protección inducida fueron evaluadas en hámsters. Se desarrollaron 2 ensayos; en el primero, 120 hámsters fueron inoculados con dos dosis de 0.5 mL por vía intramuscular (IM), con un intervalo de 6 semanas. Se realizaron tres muestreos de sangre a las 0 (T0), 6 (T6) y 9 (T9) semanas. La respuesta IgG se evaluó mediante ELISA y la protección mediante el reto con cepas virulentas de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*. En el segundo ensayo 180 hámsters fueron inoculados con una dosis y retados a los 45 días, 3 y 7 meses después de la aplicación de la vacuna. Los resultados mostraron que la respuesta IgG en los hámsters inoculados con la VA fue significativamente mayor que la obtenida frente a la VNA. Ambas variantes protegieron frente al reto con 1 000-10 000 DL₅₀. Se demostró que la VA indujo una inmunidad más duradera que la VNA, protegiendo contra la infección renal de los tres serovares de reto.

Palabras claves: leptospirosis, vacuna adsorbida, vacuna no adsorbida, capacidad inmunogénica, capacidad protectogénica, hámsters

Biotecnología Aplicada 2004;21:148-152

ABSTRACT

Comparative study of the immunogenicity and protective capability in hamsters of adsorbed and non adsorbed vaccines against leptospirosis. Two experimental vaccines based on inactivated whole cells were formulated: non adsorbed (NAV) and adsorbed in aluminium hydroxide (AV), containing 50-80x10⁶ cells of serovars *L. canicola*, *L. copenhageni* and *L. mozdok* per 0.5 mL dose. The immunogenicity and protection were evaluated in hamsters. Two assays were developed; in the first one 120 hamsters were inoculated by intramuscular (IM) route with two dose of 0.5 mL each, six weeks apart. Blood samples were taken at 0 (T0), 6 (T6) and 9 (T9) weeks. The IgG immune response was evaluated by ELISA and the protection induced, by challenge against virulent strains of *L. canicola*, *L. copenhageni* and *L. mozdok*. In the second assay 180 hamsters were inoculated with a single dose and challenge 1.5, 3 and 6 months later. The results showed that IgG response of hamsters vaccinated with AV was significantly higher than the response of the ones vaccinated with NAV. Both vaccines protected against challenge with 1000-10 000 LD₅₀ of the strains, but AV induced a longer immunity and protected also against renal infection.

Keywords: leptospirosis, adsorbed vaccine, non adsorbed vaccine, immunogenic capacity, protective capacity, hamsters

Introducción

La leptospirosis es una de las zoonosis de más amplia distribución mundial. Es causada por espiroquetas pertenecientes al género *Leptospira* y la especie patógena *L. interrogans* [1]. La enfermedad en el hombre, adquirida por el contacto con los reservorios o con un medio contaminado con la orina de estos animales, produce una gran variedad de manifestaciones clínicas, y las formas más severas se asocian a una letalidad entre 5-40% [2, 3].

En Cuba, desde el año 1868 el Dr. Francisco Navarro y Valdés sospechaba de esta enfermedad, reportándose el primer brote en 1910 y la primera

comprobación bacteriológica por el aislamiento de una cepa de *L. icterohaemorrhagiae* se obtuvo en 1945 [4-6].

En la década de los años 70 se originaron varios brotes de leptospirosis humana. En 1980 ocurrió un brote de gran magnitud en cortadores de caña de azúcar ubicados en la provincia Camagüey. Del estudio epidemiológico realizado se derivó la necesidad de establecer un Programa Nacional de Control para el enfrentamiento de la enfermedad, el cual se puso en vigor en 1981 [7, 8].

Los estudios inmunoepidemiológicos de la leptospirosis reportaron que los serogrupos más frecuentes

1. Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. WHO, Geneva, 1982.

2. Farr RW. Leptospirosis. Clin Infect Dis 1995;21:1-6.

3. Albert IK. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. The Lancet 1999; 354:820-825.

4. Navarro Valdés FM. La Fiebre Biliosa grave de los países cálidos no es la Fiebre Amarilla (Tesis doctoral). Anal Acad Cienc Med Fis Nat Habana 1968.

en Cuba encontrados en hombres, animales, agua y suelo por diagnóstico serológico hasta 1993 eran: *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Pomona*, *L. Canicola* y *L. Hebdomadis*; el más frecuente en brotes epidémicos resultó ser *L. pomona* [8].

La evolución de la leptospirosis humana durante el período comprendido entre 1981 a 1994, se caracterizó por mantener una tendencia ascendente de la morbilidad y ligeramente descendente de la letalidad. En 1994 se registró una tasa de incidencia de 25.6 por 100 000 habitantes, constituyendo este un año epidémico para el país [7, 8].

El control de la leptospirosis depende del uso de medios de protección así como del control de vectores, entre otros; mientras que entre las medidas profilácticas se encuentran el tratamiento quimioprofiláctico mediante la aplicación de la Doxiciclina y la vacunación.

Las vacunas conocidas hasta el momento que se han aplicado en humanos son suspensiones de células inactivadas mediante la acción de agentes químicos como el formaldehído o inactivación física por calor [9, 10] cuya concentración antigénica promedio por serovar y por dosis de vacuna se encuentra entre 100-200 leptospirosis. Estas vacunas confieren protección por un período no mayor de 1 año, siendo necesaria la reactivación anual en períodos epidémicos de la enfermedad [10].

El efecto modulador de la respuesta inmune por el hidróxido de aluminio ya ha sido estudiado [11]. Es por eso que la necesidad de inducir una respuesta inmune más potente y una memoria inmunológica mayor hace pensar en la inclusión del hidróxido de aluminio en una formulación de células inactivadas como elemento potenciador de la respuesta inmune. Además, su acción detoxificante, ya demostrada [12], contribuye a la disminución de la reactividad de la preparación vacunal formulada.

La producción de vacunas, como medida profiláctica contra la leptospirosis, tiene como elemento fundamental la selección adecuada de las cepas que integrarán la formulación, teniendo en cuenta que estas sean representativas de los serovares de mayor circulación en la región, así como que sean cepas altamente virulentas [10]. Otro elemento lo constituye el número de cepas a incluir en la formulación, reportándose de 3 a 4 como máximo en vacunas fluidas y hasta 7, en vacunas concentradas [13]. El medio de cultivo también es de vital importancia, dado el carácter reactogénico que incorporan a las vacunas la presencia de proteínas contaminantes [14].

El modelo animal Hámster Sirio Dorado ha sido reportado para la evaluación de vacunas contra la leptospirosis [1, 15].

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos formular una variante de vacuna como medida profiláctica contra la leptospirosis humana a partir de cepas autóctonas inactivadas, de los serovares de mayor circulación en el país y que tuviera en su composición el hidróxido de aluminio como adyuvante.

Materiales y métodos

Cepas

Cepas autóctonas provenientes del Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico del Instituto Nacional de

Medicina Veterinaria: Cepa 87, *Leptospira Canicola* serovar *canicola*; Cepa 69, *Leptospira Icterohaemorrhagiae* serovar *copenhagani* y Cepa 108, *Leptospira Pomona* serovar *mozdok*. Estas fueron clasificadas mediante la técnica de microaglutinación (MAT) con anticuerpos monoclonales en el Laboratorio de Referencia (OMS) del Tropical Royal Institute de Amsterdam, Holanda.

Preparación de los antígenos

Las cepas fueron subcultivadas en medio Tween-Albúmina (TA) [16], durante 7 días a 28 °C en estacionario. Luego se pasaron a medio libre de proteínas [17], para una densidad óptica (DO) inicial de 0.1 a 400 nm, ajustada en un espectrofotómetro (Pharmacia). Se cultivaron durante 4 días a 28 °C en sistema con agitación orbital a 130 rpm. Al cabo de este tiempo se les realizó control de pureza, mediante tinción de Gram, y virulencia [18]. Los cultivos se inactivaron con formaldehído tamponado pH 7.2 a una concentración final de 0.5% (v/v), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 3000 g durante 30 minutos y las células fueron lavadas 3 veces con Solución Salina Tamponada con Fosfatos (SSTF) pH 7.2-7.4. Por último, se ajustaron a una concentración final de 500 x 10⁶ leptospirosis/mL, mediante conteo en cámara de Petroff Hausser, conservándolas a 4 °C hasta su utilización.

Formulación de las variantes de vacuna

Componentes básicos por dosis de 0.5 mL:

Variante Adsorbida (VA)

Células de <i>L. Canicola</i> serovar <i>canicola</i>	50-80x10 ⁶
Células de <i>L. Icterohaemorrhagiae</i> serovar <i>copenhagani</i>	50-80x10 ⁶
Células de <i>L. Pomona</i> serovar <i>mozdok</i>	50-80x10 ⁶
Hidróxido de aluminio (Alhidrogel)	1.00 mg
Tiomersal	0.05 mg
SSTF* (CSP)**	0.5 mL

Placebo de la Variante Adsorbida (PVA)

Hidróxido de aluminio (Alhidrogel)	1.00 mg
Tiomersal	0.05 mg
SSTF* (CSP)**	0.5 mL

*Solución salina tamponada con fosfatos.

**Cantidad suficiente para.

La variante de vacuna no adsorbida (VNA) y su placebo (PNA) se prepararon de igual forma que las variantes descritas, pero sin el hidróxido de aluminio.

Modelo animal

Se utilizaron Hámsters Sirio Dorado (*Mesocricetus aureatus*), hembras con peso promedio de 35-50 g, procedentes del CENPALAB. La atención de los animales se realizó de acuerdo a las normas institucionales establecidas para el cuidado y uso de animales pequeños [19].

Ensayo 1

Evaluación de la capacidad inmunogénica de la VA y VNA en hámsters

Esquema de inmunización

Se inocularon 120 hámsters, 30 por cada una de las variantes (VA, VNA, PVA y PVNA). Los animales

5. Guiteras JM, Lebreto A, Hoffman E. *Leptospira icterohaemorrhagiae* en La Habana. *Anal Acad Cienc Med Fis Nat Habana* 1921;57:462-4.

6. Márquez V, Soler R, Curbelo E. Enfermedad de Weil en Cuba: Comprobación bacteriológica. *Acad Cienc Med Habana* 1944-1945;83(4):196.

7. Raúl CP, Salabarría LG, Blanco, Machado FO, Obregón AM, Alvarez SR, Martínez SR, González GM y col. Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis Humana. MINSAP 1998.

8. Raydel MS, Cruz de la Paz R, Lopez AC. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 1993; 45(1): 32-41.

9. Adler B, Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J Hyg Cam* 1980;84:1-10.

10. Chen Ting-zuo. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann Immunol Hung* 1986; 26:125-51.

11. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol* 1985;61(1):143-51.

12. Shi Y, HogenEsch H, Regnier FE, Hem SL. Detoxification of endotoxin by aluminium hydroxide adjuvant. *Vaccine* 2002;19(13-14):1747-52.

13. Minum Requirements of Weil's Disease and Akiyami Combined Vaccine in Report of discussions of the WHO working group on Leptospirosis vaccine development and vaccinology. Nagoya, Japan, 26-27 March 1993.

14. Hussein MM, Shibley GP. Cellular and Whole-Culture Bivalent Leptospiral Bacterins: Safety and Potency in Guinea Pigs and Hamsters. *Am J Vet Res* 1973; 34(1):115-7.

15. Oliva R, Infante JF, González M. Pathological-Clinical Characterization of Leptospirosis in Golden Syrian Hamster Model Arch Med Res 1994; 25(2):165-70.

16. Ellinghausen HC, Cullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes, fractionation of oleic albumin complex and a medium of albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965;26:45-51.

17. Lisset E, González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Batista N, Yi R, Oliva R, González I, Herrera B. Evaluación del crecimiento de *Leptospira interrogans* en un medio libre de proteínas. Evaluación de la capacidad protectora de una preparación vacunal. Abstracts. 1er Congreso Argentino, 1er Congreso Latinoamericano de Zoonosis, Buenos Aires, 1995: 52.

18. Norma Ramal No. 673. Diagnóstico Veterinario de la leptospirosis. Diagnóstico de Laboratorio. Ministerio de la Agricultura. Cuba 1984.

19. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 2. Ottawa, Ontario: EDI-TORIAL;1980. p. 84.

inoculados con PVA y PVNA sirvieron como controles. Se aplicaron dos dosis de 0.5 mL por vía intramuscular (IM) profunda, dividida en dosis de 0.25 mL en la cara interna de cada una de las extremidades posteriores, en los músculos biceps femoral y semitendinoso, con un intervalo de 6 semanas entre dosis.

Muestreos

Se realizaron tres muestreos en 5 de los 30 hámsters de cada variante: antes de la primera dosis y a las 6 y 9 semanas posteriores, mediante la extracción de sangre del plexo retroorbital. La sangre fue centrifugada a 2 500 g durante 5 minutos y el suero se conservó a -20°C hasta su utilización.

Evaluación de la respuesta IgG específica

La respuesta IgG inducida en los hámsters contra los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*, se evaluó mediante un sistema ELISA de células fijadas a la placa, ajustadas a una concentración de 200×10^6 leptospiaras/mL. Las placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar) fueron recubiertas con 100 µL de cada antígeno por separado e incubadas toda la noche a 50 °C hasta desecación total. Luego fueron lavadas 4 veces con SSTF más 0.05% de Tween 20 (SSTF-T) y bloqueadas 1 h a temperatura ambiente con SSTF más 3% de leche descremada. Posteriormente se adicionaron las muestras de suero diluidas 1:200 en SSTF-T más 3% de leche descremada y las placas fueron incubadas 1 h a 37°C en cámara húmeda. Luego se adicionó el conjugado anti IgG de hámster-peroxidasa producido en carnero, diluido 1:5 000 en la misma solución de las muestras y las placas se incubaron nuevamente 1 h a 37 °C. Por último, la reacción fue revelada con ortofenilendiamina (OPD) en tampón citrato pH 5 más peróxido de hidrógeno 30%, deteniéndose a los 30 minutos con ácido sulfúrico 12.5%. La lectura de la DO se realizó en un lector de ELISA (Titertek Multiskan).

Determinación de la DL₅₀

Se realizaron diluciones seriadas con factor de 10 a partir de la dilución de reto hasta 10⁷, inoculándose 0.5 mL de cada dilución a cinco hámsters por vía intraperitoneal (IP). Los animales fueron observados durante 14 días y las muertes registradas. El cálculo de la DL₅₀ se realizó mediante el método de Reed y Muench [20].

Reto

Después de 21 días de aplicada la segunda dosis, 10 hámsters de cada grupo fueron inoculados por vía IP con 0.5 mL de la dilución de un cultivo de 7 días, crecido en medio TA, conteniendo entre 1 000 y 10 000 DL₅₀ de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*, respectivamente. Los animales fueron observados durante 14 días y registradas las muertes.

Estudio de prevalencia [21, 22]

Los animales que sobrevivieron al reto fueron sacrificados y se realizó siembra de hígado y riñón en medio TA. Las muestras se incubaron a 28 °C durante 30 días y se evaluó la presencia de *Leptospira* mediante la observación al microscopio de campo oscuro OPTON.

Estudio anatomopatológico

Se tomaron muestras de riñón e hígado de todos los animales del ensayo, muertos o sobrevivientes, se fijaron en una solución de formalina neutra al 10% y posteriormente fueron embebidas en parafina. Se realizó tinción de Hematoxilina Eosina (HE) y tinción especial de Warthin-Starry para evidenciar la presencia de *Leptospira* [23].

Ensayo 2

Evaluación de la protección inculda en el tiempo después de la aplicación de una dosis de las VA y VNA en hámsters

Se inocularon 360 hámsters, 90 con cada una de las variantes a evaluar (VA, VNA, PNA y PVNA). Treinta animales fueron retados a los 45 días, 3 y 7 meses después de inmunizados con cepas virulentas de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*, (10 por cada serovar). Se retaron además 10 hámsters controles no inmunizados por serovar. El procedimiento seguido para el reto y control de la DL₅₀ de las cepas se describió en el Ensayo 1.

El Protocolo desarrollado fue sometido a revisión por parte de la Comisión de Ética del Instituto Finlay.

Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Barlett. Si cumplían las anteriores premisas se emplearía el análisis de varianzas de clasificación simple y para comparar las medias entre los grupos, la prueba t de rangos múltiples de Bonferroni. De no cumplir las premisas anteriores, se utilizaría la prueba de Kruskal-Wallis y para comparar entre grupos se aplicó la prueba de la suma de rangos múltiples de Dunns.

Resultados

Los resultados de la evaluación por ELISA del nivel de IgG inducido en los hámsters inmunizados contra los tres serovares componentes de las vacunas aparecen reflejados en las figuras 1, 2 y 3.

El procesamiento estadístico de los valores de DO en el ELISA representativos de los niveles de IgG inducidos, evidenció que estos no seguían una distribución normal. Los resultados de las pruebas no paramétricas se indican en la figura, mostrándose la existencia de diferencias significativas a una $p < 0.05$ entre los niveles de IgG obtenidos con la VA respecto a la VNA después de la aplicación de la primera y segunda dosis.

En el ensayo 1 se obtuvo 100% de sobrevivencia en los hámsters inmunizados con las variantes VA y VNA, con respecto a 100% de mortalidad en los hámsters que recibieron los placebos. La DL₅₀ de las cepas de reto estuvo entre 1 000 y 10 000 DL₅₀. En el estudio anatomopatológico, los órganos provenientes de hámsters vacunados no mostraron ninguna alteración morfológica, mientras que los de los placebos muertos durante el reto mostraron, a la tinción con HE, riñones congestionados y focos hemorrágicos a nivel de las zonas corticales y medulares. Resultados semejantes fueron previamente reportados por Alves y colaboradores (1991) [21] en

20. Reed LJ, H Muench. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.

21. Alves VA, Gayotto CC, Yasuda PH, Wakamatsu A, Kanamura CT, De Brito T. Leptospiral antigens (*L. interrogans* serogroup *icterohaemorrhagiae*) in the kidney of experimentally infected guinea pigs and their relation to the pathogenesis of the renal injury. *Exp Pathol* 1991;42:81-93.

22. Alves VA, Gayotto CC, De Brito T, Telma MR, Santos A, Wakamatsu MR, Vianna E. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage. *Exp Toxic Pathol* 1992; 44:425-34.

23. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York, Mc. Graw-Hill Book Copenhagen 1968.

riñón de curiel infectados experimentalmente con *L. interrogans* serogrupo *Icterohaemorrhagiae*. El hígado presentó congestión, pérdida de la organización de los cordones de hepatocitos y diferentes grados de degeneración, así como necrosis y depósitos de hemosiderina. Resultados semejantes fueron reportados por Alves y colaboradores (1992) [22].

La identificación de *Leptospira* mediante la tinción de Warthin-Starry en el riñón de los animales que recibieron los placebos (muertos en el ensayo), corroboró el diagnóstico de leptospirosis y demostró la capacidad invasiva de este microorganismo.

En el estudio de prevalencia no se observó crecimiento de *Leptospira* en los cultivos de órganos provenientes de los hámsters inoculados con VA, mientras que en el caso de las muestras de hámsters inoculados con VNA, se observó *Leptospira* en 30% de las muestras provenientes de hámsters retados con *L. mozdok* y en 10% de las muestras de los retados con *L. canicola*. No se observó crecimiento de *Leptospira* en los cultivos de las muestras de hámsters retados con el serovar *L. copenhageni*.

El reto efectuado a los hámsters inmunizados con una sola dosis de las VA y VNA evidenció 100% de sobrevivencia en ambas variantes a los 45 días y 3 meses de aplicada la dosis inmunizante, respecto a 100% de mortalidad en los animales placebo. Sin embargo, al cabo de los 7 meses, se observó una disminución en el nivel de protección inducida en los hámsters inmunizados con la VNA al obtenerse 40, 50 y 20% de sobrevivencia después del reto con los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok* respectivamente, mientras que en los hámsters inmunizados con la VA, se mantuvo 100% de sobrevivencia.

Discusión

La formulación de la vacuna antileptosirósica que se describe en este artículo representa la primera variante de vacuna adsorbida propuesta para uso en humano, ya que en animales es frecuente el empleo de adyuvantes en la preparación de bacterinas como medida profiláctica contra la leptospirosis [14].

Una adsorción satisfactoria (80-100%) garantiza una buena presentación antigénica al sistema inmune del individuo inmunizado; esto determina una adecuada respuesta inmune. Ha sido demostrado que el hidróxido de aluminio, además de tener una función potencializadora de la respuesta inmune, al ejercer su efecto regulador a nivel de las células presentadoras de antígenos y las células accesorias liberadoras de mediadores importantes de la inmunidad [11], ejerce también una acción detoxificante sobre las endotoxinas mediante la adsorción de ellas en la vacuna imposibilitando entonces su liberación al fluido intersticial después de la administración [12].

La presencia del hidróxido de aluminio en la formulación evaluada permitió la inducción de una respuesta IgG significativamente mayor que la observada frente a la VNA. La respuesta obtenida ante ambas variantes fue capaz de proteger a los hámsters vacunados frente al reto con 1000-10 000 DL₅₀ de cepas altamente virulentas de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*; sin embargo, la diferencia entre ambas variantes se pone de manifiesto al observar que con la VNA no se logró el mismo nivel

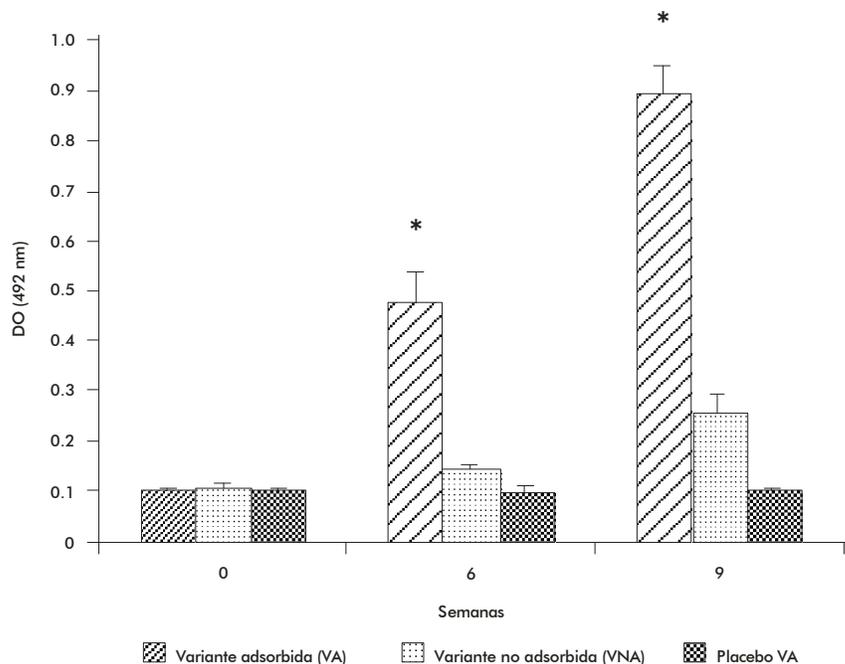


Figura 1. Respuesta IgG determinada por ELISA utilizando como recubrimiento células de *L. canicola*, en hámsters inmunizados con dos dosis de variantes de vacuna adsorbida y no adsorbida (0, 6 y 9 semanas postvacunación). En la figura no aparecen representados los valores obtenidos frente al placebo de la variante no adsorbida, por haberse observado la misma respuesta en ambos grupos. (*) Diferencias significativas entre los niveles de IgG inducidos por la variante adsorbida respecto a la variante no adsorbida a una $p < 0.05$.

de protección contra el estado de portador que el obtenido en los animales vacunados contra la VA. Resultados semejantes han sido obtenidos por otros investigadores [24] al evaluar bacterinas no adsorbidas

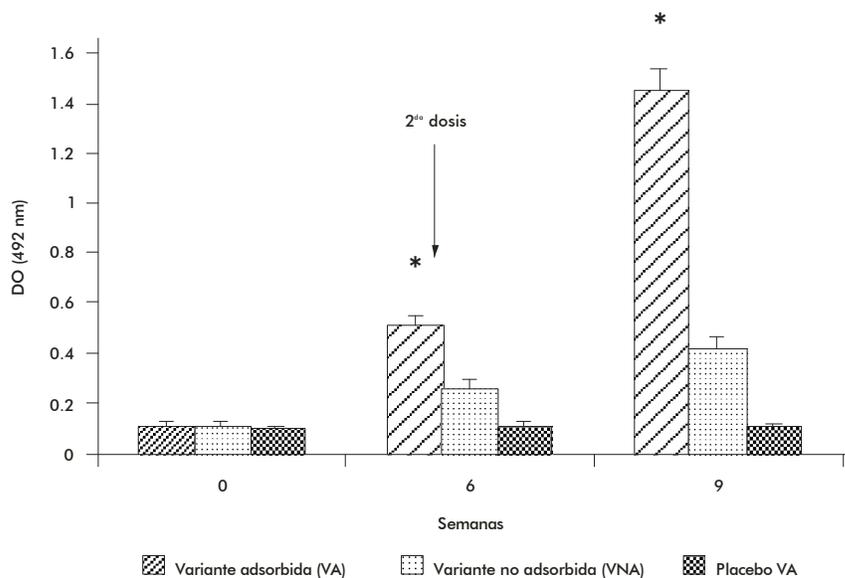


Figura 2. Respuesta IgG determinada por ELISA utilizando como recubrimiento células de *L. copenhageni*, en hámsters inmunizados con variantes de vacuna adsorbida y no adsorbida (0, 6 y 9 semanas postvacunación). En la figura no aparecen representados los valores obtenidos frente al placebo de la variante no adsorbida, por haberse observado la misma respuesta en ambos grupos. (*) Diferencias significativas entre los niveles de IgG inducidos por la variante adsorbida con respecto a la variante no adsorbida a una $p < 0.05$.

en hámsters donde se obtienen niveles de prevalencia de *Leptospira* en los órganos de los hámsters vacunados 20 días después del reto.

La protección contra la infección renal es un criterio importante de la inmunogenicidad y de la capacidad protectogénica de una vacuna contra la leptospirosis, ya que el hábitat natural de *Leptospira* es en los túbulos renales de los riñones de los mamíferos [23, 24]. Se demostró el desarrollo de la enfermedad en los placebos al evidenciar el daño hepático y renal, así como la presencia de *Leptospira* en riñón mediante la tinción especial de Warthin Starry.

Otro elemento importante a considerar de los resultados lo constituye el hecho de que al cabo de los 7 meses de aplicada una dosis de la vacuna los hámsters vacunados con la VA son capaces de sobrevivir al reto, obteniéndose 100% de sobrevivencia con respecto a los hámsters vacunados con la VNA en los cuales se observa mortalidad frente a cada uno de los serovares de reto. Esto nos indica el establecimiento de una memoria inmunológica inducida por la VA.

Es bueno destacar también que se obtiene respuesta contra cada uno de los serovares implicados en la formulación, no obstante encontrarse la concentración de leptosiras por serovar por dosis de vacuna por debajo del límite reportado por otros investigadores para vacunas antileptospirósicas para uso humano [10]. Es evidente, dado los resultados, que la presencia del hidróxido de aluminio representa un componente importante en la inducción de una respuesta inmune potente, capaz de proteger no solo contra la acción letal del microorganismo, sino también de prevenir la infección renal contra los tres serovares presentes en la vacuna. Esto demuestra que la proporción de los antígenos es adecuada ya que, al nivel de dosis de reto evaluada, no se evidencia la inmunodominancia de ningunos de los antígenos que integran la formulación vacunal evaluada.

Aunque se ha establecido que la inmunidad contra la leptospirosis es de naturaleza humoral, algunos

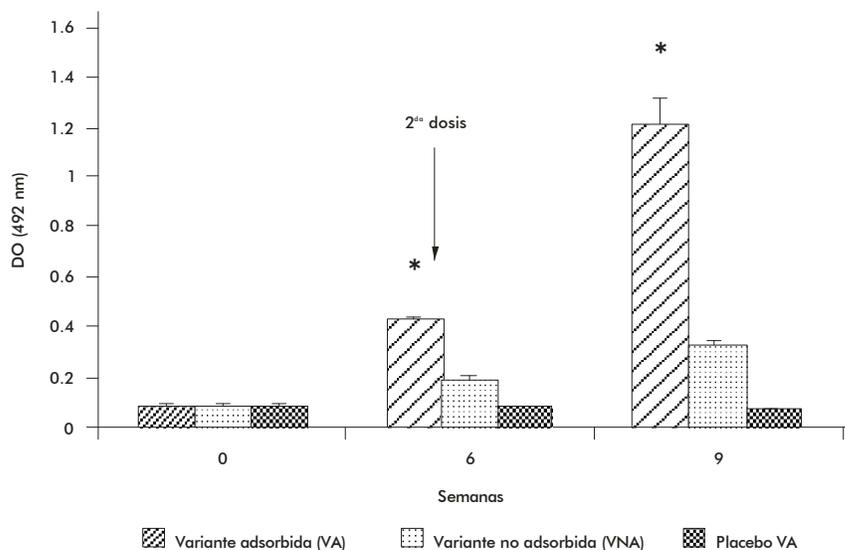


Figura 3. Respuesta IgG determinada por ELISA utilizando como recubrimiento células de *L. mozdok*, en hámsters inmunizados con las variantes de vacuna adsorbida y no adsorbida. (0, 6 y 9 semanas postvacunación). En la figura no aparecen representados los valores obtenidos frente al placebo de la variante no adsorbida, por haberse observado la misma respuesta en ambos grupos.

(*)Diferencias significativas entre los niveles de IgG inducidos por la variante adsorbida con respecto a la variante no adsorbida a una $p < 0.05$.

autores han sugerido la posibilidad del establecimiento de inmunidad celular contra esta enfermedad [25-27]. Recientemente se ha reportado la inducción de una potente respuesta Th1 en ganado vacuno por una vacuna de células inactivadas y adyuvada con hidróxido de aluminio [28]. Debido a la similitud en la naturaleza del antígeno, la presencia del adyuvante y los resultados de protección en hámsters pudiéramos inferir que en el caso de los hámsters inmunizados con la VA pudiera haberse inducido también una respuesta inmune de esta naturaleza.

24. Miller NG, Wilson RB. Electronic microscopic study of the relationship of *Leptospira pomona* to the renal tubules of the hamster during acute and chronic leptospirosis. Am J Vet Res 1967;28: 225-35.

25. Shenberg E, Torten M. A New Leptospirosis Vaccine for use in man. I Development of a vaccine from *Leptospira* Grown on a Chemi-

cally Defined Medium. J Inf Dis 1973; 128(5):642-6.

26. Russell FG, Russell JC. Immunogenicity and humoral and cell-mediated immune response to leptospiral whole cell, outer envelope, and protoplasmic cylinder vaccines in hamsters and dogs. Am J Vet Res 1982;43(5):835-40.

27. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microb Rev 2001;14(2):296-326.

28. Naiman BM, Alt D, Bolin C, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. Infect Immun 2001;69:12:7550-7558.

Recibido en septiembre de 2003. Aprobado en febrero de 2004.