

## Inmunogenicidad y capacidad protectora en hámsters de preparaciones vacunales monovalentes de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum

✉ Andrés González Rodríguez, Yoandra Rodríguez Jiménez, Niurka Batista Santiesteban, Yolanda Valdés Abreu, Juan F Núñez Osenes, Marta González González

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas, Ave. 27 No 19805, La Lisa, AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 208 6075; Phone: (53-7) 202 0986; E-mail: andresglez@finlay.edu.cu

### RESUMEN

Fueron evaluadas en hámsters la inmunogenicidad y la capacidad de protección homóloga y heteróloga de preparaciones vacunales monovalentes formuladas a partir de 2 cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. Los niveles de aglutininas séricas inducidos fueron estimados mediante la técnica de aglutinación microscópica. La actividad IgG específica fue cuantificada mediante un sistema ELISA indirecto cuantitativo de células enteras. La capacidad de protección homóloga y heteróloga contra la infección letal y el estado de portador se determinó mediante el reto con 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de 5 cepas altamente virulentas que pertenecen a los serogrupos Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Los resultados obtenidos demostraron una alta inmunogenicidad y capacidad de protección homóloga de ambas preparaciones vacunales del serogrupo Ballum y una menor pero significativa protección cruzada frente al reto con 100 DL<sub>50</sub> de Canicola. Asimismo se demostró la existencia de correlación entre los niveles de seroconversión de anticuerpos IgG específicos en la población animal vacunada y la protección contra la infección letal y el estado de portador frente al reto experimental con 10 000 DL<sub>50</sub>.

**Palabras claves:** *Leptospira*, vacunas, inmunogenicidad, protección

*Biotecnología Aplicada* 2003;20:222-227

### ABSTRACT

**Immunogenicity and protective capacity of *Leptospira interrogans* serogroup Ballum monovalent vaccines in hamsters.** Immunogenicity and protective capacity of *Leptospira interrogans* serogroup Ballum monovalent vaccines formulated from two candidate vaccine strains were evaluated in hamsters. Specific agglutinins levels were estimated by microscopic agglutination test. IgG activity was quantified by whole cell based enzyme-linked immunosorbent assay. Homologous and cross protective capacity against death and kidney infection after challenges by 100 and 10 000 LD<sub>50</sub> of five highly virulent strains belonging to Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae and Pomona serogroups were determined. Both monovalent vaccines were highly immunogenic and induced complete homologous protection while cross protection against heterologous serogroups was only significant upon challenge by 100 LD<sub>50</sub> of Canicola. The results showed a correlation between IgG seroconversion in vaccinated animals and protection against challenge by 10 000 LD<sub>50</sub>.

**Keywords:** *Leptospira*, vaccines, immunogenicity, protection

### Introducción

La leptospirosis es la zoonosis bacteriana de más amplia distribución mundial y tiene gran impacto en la medicina humana y veterinaria, así como en la economía de países ricos y pobres [1, 2]. Esta enfermedad es causada por una espiroqueta que pertenece a la especie fenotípica *Leptospira interrogans*, caracterizada por una fina morfología y activa motilidad e integrada por más de 200 serovariedades (serovares) patógenas agrupadas en 24 serogrupos [1]. El lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa es la base del tipaje serológico [3].

Las graves pérdidas económicas y humanas causadas por esta enfermedad justifican el uso de vacunas profilácticas en poblaciones humanas y animales bajo riesgo de infección. Dada la inmunodominancia del LPS las vacunas antileptospirósicas disponibles en la actualidad, constituidas por células enteras inactivadas, confieren una inmunidad serogrupo/serovar específica predominantemente humoral [1]; aunque estudios recientes sugieren la existencia de inmunidad cruzada con capacidad protectora entre

serogrupos diferentes, asociada a proteínas altamente conservadas [4, 5].

La aplicación en Cuba a grupos humanos de riesgo de la vacuna trivalente vax-SPIRAL<sup>®</sup>, diseñada para establecer protección contra los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, ha logrado controlar y disminuir la morbilidad y letalidad de la leptospirosis humana con una elevada efectividad [6, 7]. Sin embargo, en los últimos años la situación inmunoepidemiológica ha variado y en la actualidad el serogrupo Ballum es el más frecuentemente aislado de pacientes con la enfermedad leptospirósica en todo el país [8] por lo que es necesario disponer de nuevas formulaciones vacunales como medida profiláctica eficaz.

Previo a la inclusión del serogrupo Ballum en una formulación vacunal para uso en humanos resulta imprescindible una adecuada selección y caracterización microbiológica de las cepas candidatas vacunales, así como investigaciones básicas en modelos animales que comprueben la capacidad inmunoprotectora de formulaciones obtenidas a partir de estas cepas, entre

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

2. World Health Organization. Leptospirosis worldwide, 1999. Wkly Epidemiol Rec 1999;74:237-242.

3. Bulach DM, Kalambaheti T, de la Pena-Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. J Mol Microbiol Biotechnol 2000;2 (4):375-80.

4. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere J, Andre-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine 2000; 19: 86-94.

5. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, et al. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. Infect Immun 2001;69 (11):6831-8.

otros ensayos preclínicos y clínicos. El presente estudio tuvo como objetivos evaluar la inmunogenicidad en hámsters de preparaciones vacunales monovalentes obtenidas a partir de 2 cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum, así como su capacidad de protección homóloga y heteróloga frente a la infección experimental por cepas pertenecientes a los 4 serogrupos de *Leptospira* de mayor circulación en humanos en Cuba.

## Materiales y Métodos

### Cepas bacterianas

En el estudio se utilizaron las cepas candidatas vacunales 12399 y 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum, las cuales fueron originalmente aisladas por hemocultivo realizado a pacientes con leptospirosis en la provincia de Holguín. Se utilizaron además las cepas vacunales 87, 169 y 108, pertenecientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente, las cuales fueron originalmente aisladas a partir de material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana. Todas las cepas fueron mantenidas rutinariamente mediante subcultivos semanales en medio EMJH [9, 10] bajo condiciones estáticas (28 °C). La virulencia fue mantenida a través de pases periódicos en hámsters según los métodos descritos [11]. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) fue determinada mediante la metodología propuesta por Fajardo y colaboradores [12].

### Formulación de las preparaciones vacunales monovalentes

Se formularon preparaciones vacunales monovalentes de células enteras inactivadas y adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio a partir de cada cepa candidata vacunal del serogrupo Ballum según la metodología utilizada para la vacuna trivalente vax-SPIRAL® [13], con ligeras modificaciones. Las cepas altamente virulentas fueron cultivadas en medio EMJH hasta finales de la fase exponencial de crecimiento. Los cultivos fueron inactivados químicamente mediante la exposición a formalina 0,5% durante 20 min. Las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas al menos tres veces con tampón fosfato salino estéril pH 7,2 (TFS: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) para ser finalmente resuspendidas en TFS hasta una concentración de 6 x 10<sup>8</sup> células/mL. Las células inactivadas y lavadas fueron adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio estéril mediante agitación lenta durante toda la noche y se le adicionó tiomersal como preservante a la formulación final. La composición por dosis (0,5 mL) de vacuna monovalente fue la siguiente:

Células enteras inactivadas.....	1,5-2,4 x 10 <sup>8</sup>
Gel de hidróxido de aluminio.....	1,00 mg
Tiomersal.....	0,05 mg

Antes y durante el proceso de formulación vacunal, fueron realizados controles de pureza, identidad y virulencia a las cepas, inactivación e identidad a los antígenos, así como esterilidad y adsorción a los preparados vacunales según los procedimientos descritos [13]. Los preparados vacunales con resultados satisfactorios en todos los controles realizados fueron envasados asépticamente en volúmenes de 5,2 mL en bulbos de cristal de 10 mL con tapa de goma y retapa metálica y luego conservados a 4 °C hasta su uso.

### Evaluación de la inmunogenicidad en hámsters

La inmunogenicidad de cada preparación vacunal monovalente se evaluó en hámsters según la vía, dosis y esquema de inmunización recomendados para la vacuna trivalente vax-SPIRAL® [14]. Grupos de 10 animales de 45-50 gramos de peso fueron inmunizados con una u otra preparación vacunal monovalente por vía intramuscular, con 2 dosis de 0,5 mL separadas por un intervalo de 6 semanas. Fueron tomadas muestras de sangre semanales por vía retroorbital a cada animal previo a la primera dosis vacunal y hasta los 21 días después de la segunda dosis. Simultáneamente se realizaron extracciones de sangre semanales a 10 animales controles no inmunizados del mismo lote. Los sueros fueron colectados por centrifugación a 5 000 rpm durante 10 min, convenientemente rotulados y conservados a -20 °C hasta su evaluación.

Los niveles de aglutininas específicas inducidos por cada preparación vacunal frente al antígeno homólogo, tras 14 días de aplicada la segunda dosis, se estimaron mediante la técnica de aglutinación microscópica (TAM) [15].

Las concentraciones de IgG específica inducidas por cada preparación vacunal frente al antígeno homólogo y a otros 4 antígenos no incluidos en la formulación, se cuantificaron mediante un sistema ELISA cuantitativo estandarizado. Se utilizó para el recubrimiento en cada caso las células completas inactivadas y lavadas de las cepas 42600, 12399, 87, 169 y 108. Las placas (COSTAR®, Corning, Estados Unidos) fueron sensibilizadas con 100 mL de antígeno ajustado a 2 x 10<sup>8</sup> células/mL y desecadas toda la noche a 50 °C. Las células no adsorbidas se eliminaron mediante lavados con agua destilada y 0,05% (v/v) de Tween 20. El bloqueo se realizó con leche descremada al 3% (p/v) en TFS. Las muestras de suero a evaluar se diluyeron 1:200 en TFS con 3% de leche descremada y 0,05% de Tween 20. Se utilizó como conjugado proteína A-peroxidasa (Sigma, Estados Unidos) diluido 1:15 000 en el mismo medio de las muestras. El revelado se realizó adicionando la mezcla sustrato-cromógeno peróxido de hidrógeno 0,03%-OPD 1 mg/mL y buffer fosfato citrato pH 5. La reacción se detuvo a los 20 min de incubación a temperatura ambiente y las absorbancias se midieron en un lector de ELISA (Titertek-Multiskan®, Joint Venture, Finlandia) a una longitud de onda de 492 nm. Los valores de absorbancia se transformaron en U/mL según la curva de calibración obtenida con un suero estándar (100 U/mL), preparado previamente a partir de la mezcla de 10 sueros de hámsters con elevados títulos de aglutininas frente a los 4 antígenos según TAM. Se consideró como criterio de seroconversión en todos los casos el incremento de al menos 4 veces las concentraciones de IgG específica tras completado el esquema de inmunización en comparación con los mismos previo a la primera dosis vacunal.

### Evaluación de la capacidad de protección homóloga y heteróloga

Se evaluó la protección homóloga y heteróloga conferida por cada preparación vacunal monovalente frente al reto con 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de cada una de las cepas candidatas vacunales de Ballum y de las cepas vacunales 87, 169 y 108 pertenecientes a los serogrupos Canicola,

6. Bedevia A. Disminuye en grupos de riesgo cifras de morbilidad por *Leptospira*. Boletín epidemiológico semanal del IPK 1999; 9 (32): 49.

7. Martínez R, Pérez A, Baró M, Álvarez M, Menéndez J, Díaz M, et al. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. Rev Panam Salud Publica 2000; 8 (6): 385-92.

8. Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C, Obregón A, Victoria B. Leptospirosis humana en Cuba. Un acercamiento al conocimiento de sus principales reservorios. Boletín Epidemiológico Semanal del IPK 2002; 12(1).

9. Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. Am J Vet Res 1965;28:39-44.

10. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperature. J Bacteriol 1967;94:27-31.

11. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne: MediSci, 1999.

12. Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, et al. Estandarización de la dosis letal 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Rev Cub Med Trop 1998;50 (1):22-6 ).

13. Instituto Finlay (Cuba). Registro Médico-Sanitario vax-SPIRAL® (Vacuna antileptospirosis trivalente). La Habana: El Instituto; 1998

14. Naranjo M, Rodríguez Y, Oliva R, Jauregui U, González M. Esquemas de inmunización en hámsters frente al preparado vacunal antileptospirosis cubano. Acta Farm Bonaerense 1999;18:121-6.

15. Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. Appl Microbiol 1973;5:65-9.

Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente. Grupos de 110 animales de 45-50 gramos de peso fueron inmunizados con una u otra preparación vacunal monovalente por vía intramuscular, con 2 dosis de 0,5 mL separadas por un intervalo de 6 semanas. Tras 14 días de completado el esquema de inmunización los animales fueron retados por vía intraperitoneal con una u otra dosis de cada cepa. Se emplearon 10 animales por variante de reto y 0,5 mL como volumen de inóculo. Un grupo de 10 animales inmunizados con cada preparación monovalente no fue retado y se tomó como control de inocuidad de las vacunas.

Todos los animales inoculados fueron observados durante un periodo de 14 días posteriores al reto, tras lo cual los sobrevivientes de cada grupo fueron sacrificados y se realizó examen anatómico-patológico macroscópico y cultivo de hígado y riñón individualmente en medio proteico EMJH, con el objetivo de determinar la prevalencia del microorganismo en los principales órganos diana de la infección leptospirósica [11, 16]. Los cultivos de órganos fueron observados periódicamente bajo el microscopio de campo oscuro y se consideró como resultado negativo la ausencia de crecimiento tras 60 días de incubación a 30°C.

#### Análisis estadístico

Los resultados de las evaluaciones serológicas realizadas así como los niveles de sobrevivencia obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el Test Exacto de Fisher de dos colas, con un nivel de significación  $\alpha=0,05$  [17]. Se analizó además la existencia de una posible correlación entre los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos y la protección en hámsters frente al reto homólogo y heterólogo con 10 000 DL<sub>50</sub> mediante la Prueba de Correlación de Pearson [17].

#### Resultados y Discusión

Fueron formuladas preparaciones vacunales monovalentes de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum con una composición similar a la vacuna trivalente vax-SPiRAL®, pero se le incorporó como principio activo una concentración de células enteras inactivadas tres veces superior a la que presenta la vacuna trivalente para cada una de sus serovariedades [13]. Al estimar mediante TAM el nivel de aglutininas específicas inducido en hámsters por cada preparación vacunal monovalente frente a sus respectivos antígenos homólogos se apreció que el 100% de los animales (10/10) alcanzó un título  $\geq 1:256$  tras 14 días de completado el esquema de inmunización con cualquiera de las dos variantes de vacuna aplicadas, mientras los títulos previos a la primera dosis vacunal fueron  $< 1:4$ , al igual que en los animales controles no inmunizados. Estos elevados títulos de aglutininas inducidos por una u otra preparación monovalente no sólo demostraron una alta inmunogenicidad sino además superaron los títulos medios homólogos inducidos en hámsters por otras vacunas antileptospirósicas adyuvadas como vax-SPiRAL® [13], lo cual pudiera deberse a la mayor concentración de epítopes inmunodominantes serogrupo/serovar específicos presentes en las formulaciones monovalentes en comparación con lo que presenta la vacuna trivalente vax-SPiRAL® para cada una de las serovariedades que la componen. Otras vacunas no adyuvadas, aunque pro-

tectoras, han sido poco inmunogénicas según TAM tanto en animales como en humanos, por lo que algunos investigadores señalan la no existencia de correlación entre los niveles de aglutininas estimados por TAM y la protección [16, 18].

La evaluación mediante ELISA de la respuesta IgG específica inducida por ambas preparaciones monovalentes frente al antígeno homólogo y a 4 antígenos heterólogos reveló una alta seroconversión ( $T_7/T_0 \geq 4$ ) frente a cualquiera de los dos antígenos del serogrupo Ballum. Ambas vacunas indujeron un incremento significativo de la actividad IgG específica a uno u otro antígeno de Ballum, aunque la magnitud de la respuesta homóloga inducida por la preparación de antígeno 12399 (Figura 1) fue muy superior a la lograda tras la inmunización con antígeno 42600 (Figura 2). Los porcentajes de serocon-

16. Shenberg E, Torten M. A new leptospiral vaccine for use in man. I. Development of a vaccine from *Leptospira* grown in a chemically defined medium. *J Inf Dis* 1973;128(5):642-6.

17. Mood A, Graibill F. Introducción a la teoría estadística. Madrid:Ediciones Aguilar, 1978.

18. Torten M, Shenberg E, Gerichter CB, Neuman P, Klingberg MA. A new leptospiral vaccine for use in man II. Clinical and serological evaluation of a field trial with volunteers. *J Infect Dis* 1973;128(5):647-51.

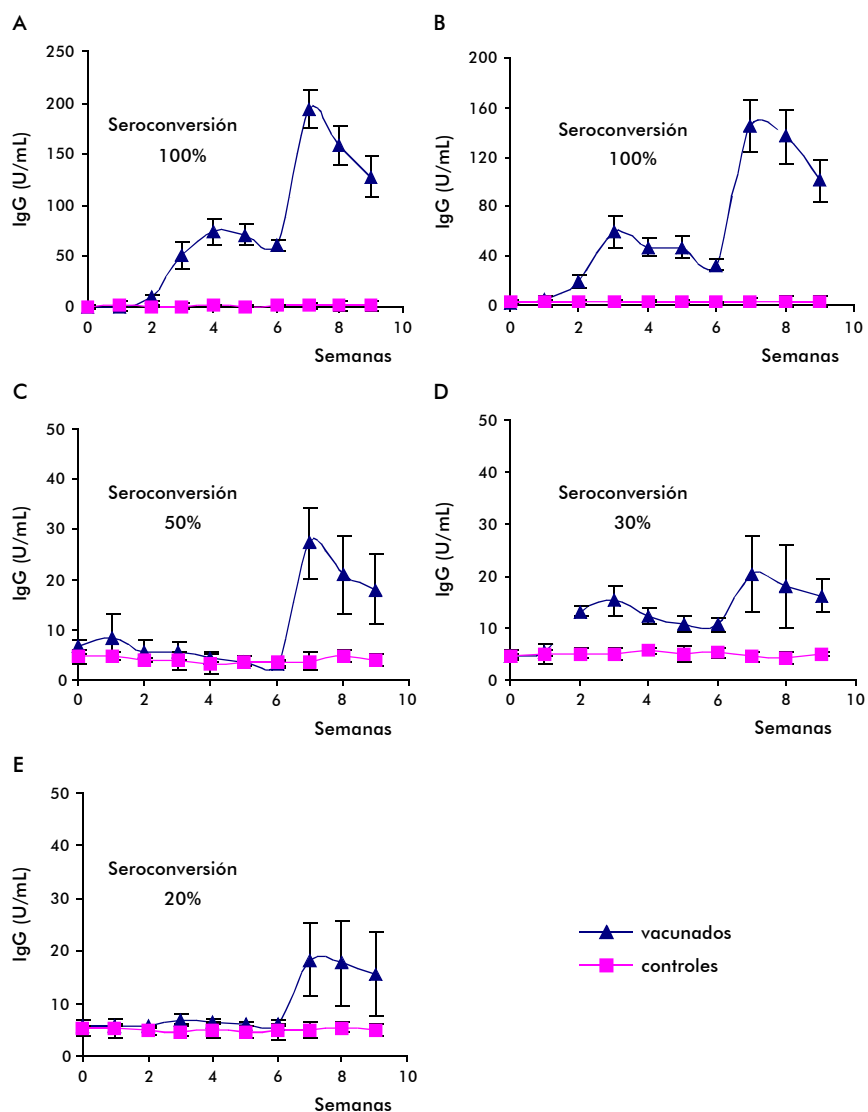


Figura 1. Respuesta IgG específica inducida en hámsters tras dos dosis de preparación vacunal monovalente de Ballum (antígeno 12399). Los niveles de anticuerpos fueron determinados mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras utilizando para el recubrimiento las cepas 12399 (A) y 42600 (B) de Ballum, 87 de Canicola (C), 169 de Icterohaemorrhagiae (D) y 108 de Pomona (E). Los datos corresponden a las medias  $\pm$  desviaciones estándar de 10 animales evaluados. La seroconversión expresada en cada caso como el porcentaje de animales con relación  $T_7/T_0 \geq 4$  del total vacunado.

versión logrados por ambas preparaciones frente a serogrupos heterólogos fueron considerablemente menores, ligeramente superiores a *Canicola* en comparación con *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*. Los resultados obtenidos demostraron que aún cuando los anticuerpos dirigidos a epítopes serogrupo/serovar específicos son mayormente de tipo IgM [19], la fracción de anticuerpos IgG dirigida a estos determinantes antigénicos también es considerable y al parecer mucho mayor que aquella dirigida a epítopes altamente conservados entre serovares diferentes. Los resultados sugirieron además una mayor comunidad antigénica del serogrupo Ballum con *Canicola*, en comparación con *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*. Una mayor presencia o expresión de epítopes inmunogénicos por parte de la cepa candidata vacunal 12399 pudiera ser la causa de su mayor inmunogenicidad en hámsters en comparación con la cepa 42600 bajo los mismos criterios de formulación.

Los resultados de las evaluaciones serológicas realizadas estuvieron en correspondencia con la protección observada en el modelo animal, lo cual corroboró la importancia de la respuesta inmune humoral en la protección contra la infección leptospirósica [1, 11]. Al evaluar la capacidad de protección homóloga y heteróloga de cada preparación vacunal monovalente frente al reto con 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de cada cepa candidata vacunal del serogrupo Ballum y de las cepas vacunales pertenecientes a los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona* se apreció que ambas preparaciones confirieron un alto grado de protección contra la infección letal frente a cualquiera de las dos cepas pertenecientes al serogrupo homólogo, mientras la protección cruzada frente a serogrupos heterólogos fue parcial y en algunos casos nula. Sólo se apreció una protección cruzada estadísticamente significativa con la preparación de antígeno 12399 frente al reto con 100 DL<sub>50</sub> del serogrupo *Canicola* (Figura 3).

Las vacunas antileptospirósicas de células enteras han sido por lo general muy eficaces en la protección contra la infección letal en los animales inmunizados, aunque esta protección es de limitada duración y restringida a la serovariedad componente y aquellas antigénicamente relacionadas [1, 7, 16]. Sin embargo, al evaluar la eficacia de una vacuna antileptospirósica se debe distinguir entre la protección contra la infección letal (muerte) y la protección contra el establecimiento del estado de portador (infección de órganos y leptospiuria). La ausencia de enfermedad en los animales inmunizados no excluye la posibilidad de que estos sean portadores asintomáticos y diseminadores del patógeno a través de la orina [1, 11]. Por tal motivo el establecimiento de una eficaz protección no solo contra la infección letal sino además contra el estado de portador debe caracterizar a una buena vacuna profiláctica contra la leptospirosis. El análisis macroscópico de órganos en los animales inmunizados sobrevivientes al reto en este estudio reveló en todos los casos la ausencia de signos característicos de la infección como endurecimiento, hemorragias o ictericia. El cultivo de varias secciones de órganos en medio EMJH arrojó en todos los casos la ausencia de crecimiento microbiano tras 60 días de incubación. Resultados similares fueron obtenidos

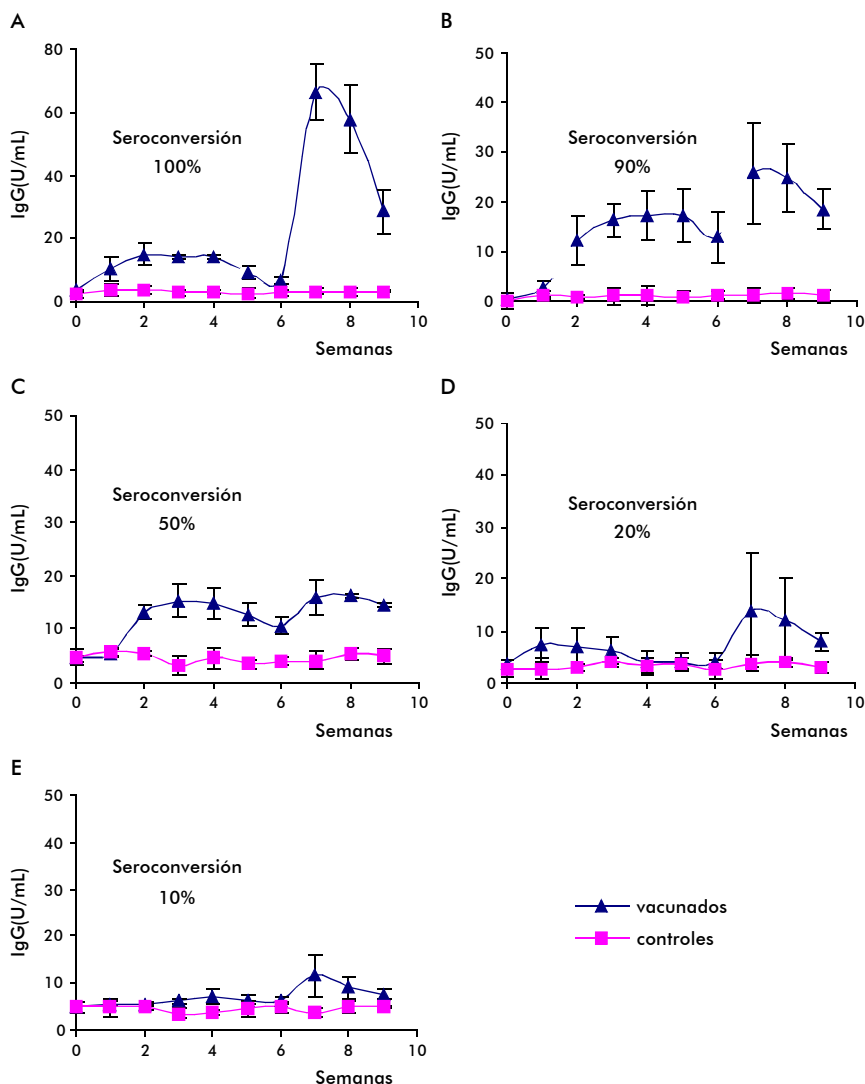


Figura 2. Respuesta IgG específica inducida en hámsters tras dos dosis de preparación vacunal monovalente de Ballum (antígeno 42600). Los niveles de anticuerpos fueron determinados mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras utilizando para el recubrimiento las cepas 42600 (A) y 12399 (B) de Ballum, 87 de *Canicola* (C), 169 de *Icterohaemorrhagiae* (D) y 108 de *Pomona* (E). Los datos corresponden a las medias  $\pm$  desviaciones estándar de 10 animales evaluados. La seroconversión expresada en cada caso como el porcentaje de animales con relación  $T_7/T_0 \geq 4$  del total vacunado.

tanto con los sobrevivientes del reto homólogo como con aquellos del reto heterólogo para cualquiera de las dos preparaciones monovalentes de Ballum evaluadas. De esta forma, ambas preparaciones vacunales lograron prevenir el establecimiento del estado de portador en todos los casos en que se registró protección contra la infección letal. Esta total protección contra el estado de portador conferida por las preparaciones monovalentes empleados en este estudio está en correspondencia con lo obtenido para otras vacunas antileptospirósicas adyuvadas [13, 20] y en ello jugó, al parecer, un papel fundamental la respuesta inmune celular potenciada por el hidróxido de aluminio [21].

Las diferencias observadas en la magnitud de la respuesta IgG inducida frente al antígeno homólogo por una y otra preparación vacunal no fueron determinan-

19. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao Reis M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001;69 (8): 4958-68.

20. Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am J Vet Res* 2001;62: 995-1000.

21. Naiman B, Blumerman S, Alt D, Bolin C, Brown R, Zuermer R, et al. Evaluation of Th1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo: Involvement of WC1(+)  $\gamma\delta$  and CD4 T cells. *Infect Immun* 2002;70 (11): 6147-57.

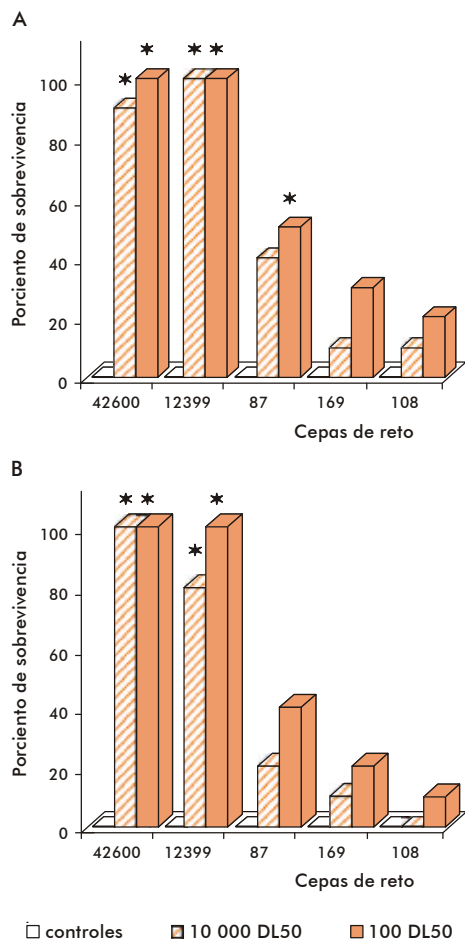


Figura 3. Protección contra la infección letal conferida en hámsters por las preparaciones vacunales monovalentes de Ballum. (A) Preparación monovalente de antígeno 12399. (B) Preparación monovalente de antígeno 42600. Las barras representan los porcentos de sobrevivencia tras el reto con 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas 42600 (Ballum), 12399 (Ballum), 87 (Canicola), 169 (Icterohaemorrhagiae) y 108 (Pomona) a los 14 días de aplicada la segunda dosis vacunal. Los asteriscos denotan diferencias significativas en la protección ( $P < 0,05$ ) respecto a los controles no inmunizados.

tes en la protección conferida dado que a pesar de estas diferencias ambos preparados fueron altamente inmunogénicos y confirieron una completa protección homóloga. Se comprobó para ambas preparaciones la existencia de correlación entre los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos en la población animal vacunada y la protección observada frente al reto con 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas utilizadas en el ensayo (Figura 4). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por González y colaboradores mediante estudios de protección pasiva en hámsters con el empleo de suero de humanos vacunados con vax-SPIRAL® [22].

Muy pocos han sido los estudios encaminados a demostrar la existencia de protección cruzada entre serogrupos diferentes de *Leptospira*. Hasta hace algunos años estaba bien establecido que la protección conferida tras una infección natural o inmunización era serogrupo/serovar específica [1, 11]; sin embargo

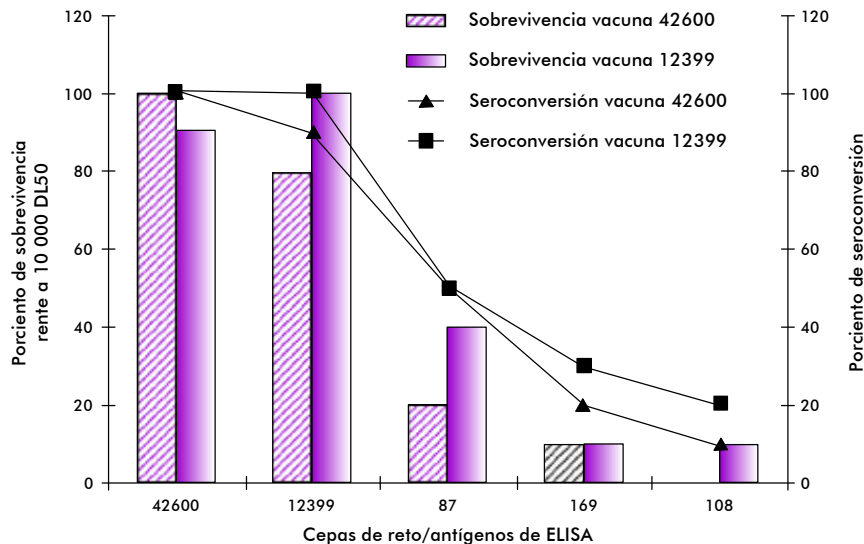


Figura 4. Correlación entre los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos en la población animal vacunada y la protección conferida contra la infección letal frente al reto con 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas 42600 (Ballum), 12399 (Ballum), 87 (Canicola), 169 (Icterohaemorrhagiae) y 108 (Pomona).

los conceptos sobre la inmunidad contra la infección leptospirósica se han ido modificando a la luz de los conocimientos actuales. Trabajos muy recientes indican la inducción de protección cruzada estadísticamente significativa por la fracción proteica de cepas de serogrupos diferentes [4, 5]. Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron una significativa protección de uno de los monovalentes de Ballum frente al reto con 100 DL<sub>50</sub> de Canicola. La magnitud de esta dosis de reto heterólogo está en correspondencia con la utilizada por Branger y colaboradores [5], por lo que pudiéramos concluir que existe protección cruzada entre los serogrupos Ballum y Canicola. La importancia de este resultado es aún más evidente si se tiene en cuenta que es muy poco probable una infección natural en animales o humanos con dosis tan elevadas como las utilizadas en este ensayo. La protección cruzada conferida frente al reto con los serogrupos Icterohaemorrhagiae o Pomona fue menos relevante.

Como resultado de este estudio se pudo comprobar la alta inmunogenicidad y capacidad protectora en hámsters de preparados vacunales monovalentes formulados a partir de 2 cepas candidatas vacunales del serogrupo de *Leptospira* de mayor circulación en humanos en Cuba no incluido en la vacuna actualmente disponible. Se demostró además la existencia de correlación entre los niveles de seroconversión de anticuerpos IgG específicos en la población animal vacunada y la protección contra la infección letal y el estado de portador frente al reto experimental con 10 000 DL<sub>50</sub> de cepas homólogas o heterólogas. Asimismo se apreció una protección cruzada estadísticamente significativa conferida por una preparación monovalente del serogrupo Ballum frente al reto con 100 DL<sub>50</sub> de una cepa altamente virulenta del serogrupo Canicola. Estudios adicionales deberán ser encaminados a la evaluación de nuevas formulaciones vacunales antileptospirósicas mono o polivalentes, así como a la valoración de los mecanismos de respuesta celular que participan en la inmunidad conferida por estas vacunas.

22. González M, Rodríguez Y, González A, Medina R, Batista N, Ferriol X, et al. Estudio de la protección pasiva inducida por el suero de vacunados con vax-SPIRAL® (Vacuna Antileptospirósica Trivalente) en hámsters frente al reto con cepas virulentas de *Leptospira canicola*, *copenhageni* y *mozdok*. *VacciMonitor* 2001; Año 10(3):16.

## **Agradecimientos**

Los autores desean agradecer al Dr. Rudy Hartskeerl del Royal Tropical Institute (KIT), Holanda por la

clasificación serológica de las cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum, así como a la Lic. Mayelín Mirabal del Instituto Finlay por el análisis estadístico de los resultados.

---

*Recibido en marzo de 2003. Aprobado en septiembre de 2003.*