

Estudio de protección con vax-SPIRAL en grupos (madre-cría) de hámsters sirio dorado

Reynaldo Oliva, Juan F. Infante, Marta González, Pedro Pérez, Mariela Naranjo, Mildrey Fariñas, Irma González, Yoandra Rodríguez

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

El objetivo del presente trabajo es estudiar la posible protección conferida por vax-SPIRAL a las crías de madres vacunadas. Se realizó un estudio inmunológico por las técnicas de ELISA y Microaglutinación (MAT) tanto en las madres como en su descendencia. Asimismo, se evaluó la prevalencia en órganos y se realizó una prueba de reto. Para ello se utilizaron Hámsters sirios dorados de ambos sexos (los machos sólo con fines reproductivos) con un peso, entre 60 y 80 g, que fueron inmunizados por vía intramuscular con una dosis de 0,5 mL de la vacuna antileptospirósica polivalente vaxSPIRAL. Se efectuaron extracciones de sangre antes de la vacunación y del reto, el cual se llevó a cabo dos semanas después de la inmunización por vía intraperitoneal y en dosis de 100, 1 000 y 10 000 DL₅₀ de cepas altamente virulentas de los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok*. Las crías fueron retadas en diferentes momentos después de nacidas (13, 22, 24, 31, 34 y 35 días) pero con 10 DL₅₀ de los mismos serovares. Los cultivos de órganos se realizaron a partir de muestras de hígado y riñón, tanto de los hámsters sobrevivientes como de los recién muertos. Los resultados mostraron que el 100% de las crías provenientes de madres vacunadas y retadas sobrevivieron, mientras que murieron todas las crías provenientes de madres no vacunadas. El test de MAT demostró la ausencia de anticuerpos aglutinantes a pesar de haber existido protección, mientras que la técnica de ELISA mostró la presencia de anticuerpos tanto en las madres como en las crías.

Palabras claves: Protección, leptospirosis, vacuna, hámster, madre- cría, vax-SPIRAL.

La producción, como medida profiláctica, de una vacuna contra la leptospirosis en nuestro país representa uno de los principales objetivos de trabajo de nuestra Institución, dada la importancia que esta enfermedad ha adquirido desde finales de la década de 1980 (1).

Como primera etapa dentro de su producción y evaluación, se han desarrollado los ensayos preclínicos, que han incluido la definición completa del producto y sus especificaciones de calidad, así como toda la documentación farmacológica y toxicológica. Los resultados farmacodinámicos abarcaron los estudios de inmunogenicidad y protección inducida en animales vacunados, siendo el Hámster sirio dorado (*Mesocricetus aureatus*) el modelo animal reportado para este fin (2).

La caracterización de la enfermedad leptospirósica en este modelo con cepas de los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* (3), permitió abordar los estudios de la protección inducida en madres vacunadas y su transmisión a la descendencia, lo que se considera una información importante dentro de las investigaciones preclínicas.

Para la realización de este trabajo se emplearon hámsters con un peso entre 60 y 80 g, de ambos sexos (63 hembras y 21 machos) procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), mantenidos bajo condiciones ambientales convencionales: 12 horas luz-oscuridad, temperatura de la habitación de 22 °C ± 1 °C y humedad relativa del 55%, alojados en cajas T3 (Macrolón), distribuidos 3 hembras y 1 macho por caja, garantizando el apareamiento en un período de 7-12 días. El alimento

consistió en pienso concentrado para roedores y agua acidulada con un pH de 2,5.

A los animales se les inmunizó con la vacuna antileptospirósica trivalente adsorbida en gel de hidróxido de aluminio (*L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*) vaxSPIRAL, Lote 4001, con una dosis de 0,5 mL por vía intramuscular en la extremidad posterior izquierda. La preparación de los inóculos para el reto consistió en la determinación de la DL₅₀ en adultos para cada uno de los tres serovares, inoculados por vía intraperitoneal en un volumen de 0,5 mL en diferentes cargas bacterianas (Tabla 1) y para las crías con 0,1 mL con 10 DL₅₀ calculada en adultos (4). Se realizaron extracciones de sangre para estudios serológicos mediante las técnicas de ELISA y MAT antes de la vacunación, antes del reto (2 semanas post-vacunación) y dos semanas después del reto. Los títulos de los sueros mediante MAT fueron determinados usando como antígeno cepas de referencia de los serovares contenidos en la vacuna, ajustadas a una concentración de 100 x 10⁶ células/mL. La dilución inicial del trabajo fue de 1:2, con diluciones dobles seriadas en tampón fosfato salino. Como controles positivos fueron considerados sueros de referencia (5). Para la evaluación de la respuesta humoral mediante ELISA se utilizó como recubrimiento un antígeno trivalente de células inactivadas y lavadas de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*, ajustados a una concentración de 200 x 10⁶ células/mL. Los sueros se diluyeron 1:320 y como conjugado se empleó una peroxidasa anti-IgG de hámster a una dilución de 1:2000.

Para las crías se controló la fecha de nacimiento y número de nacidas vivas, muertas y abortadas, tanto de animales vacunados como de controles no vacunados; se les realizaron

extracciones de sangre antes y dos semanas después del reto; éstas fueron retadas a los 13, 22, 24, 31, 34 y 35 días de nacidas.

Tabla No. 1. Diseño experimental

Variante	Grupo	Cant. animales		Dosis de reto por serovar LD ₅₀
		Hembras	Machos	
V	I	9	3*	<i>L. canicola</i> 100, 1000, 10 000
	II	9	3*	<i>L. copenhageni</i> 100, 1000, 10 000
	III	9	3*	<i>L. mozdok</i> 100, 1000, 10 000
NV ₁	IV	9	3*	<i>L. canicola</i> 100, 1000, 10 000
	V	9	3*	<i>L. copenhageni</i> 100, 1000, 10 000
	VI	9	3*	<i>L. mozdok</i> 100, 1000, 10 000
NV ₂	VII	9	3*	-----

Leyenda:

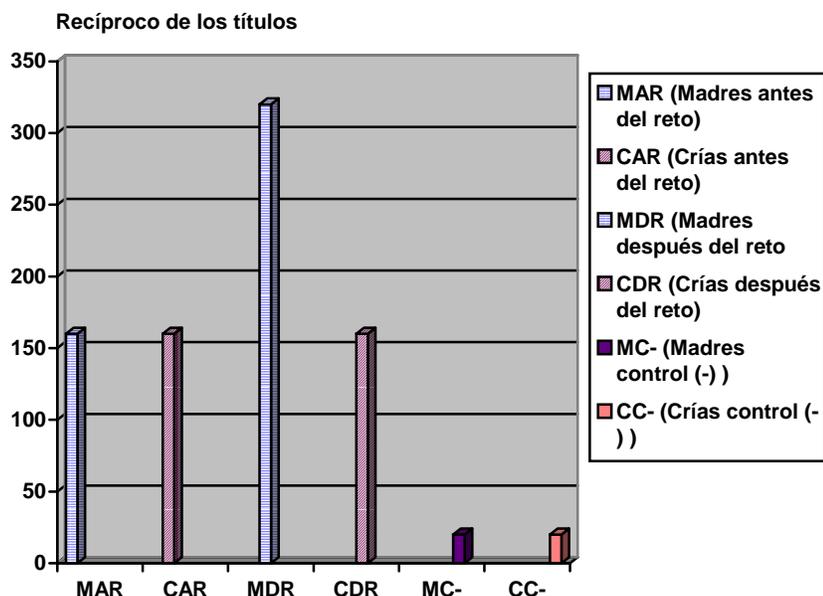
- V = Animales vacunados y retados
- NV₁ = Animales no vacunados y retados
- NV₂ = Animales no vacunados y no retados
- * = No retados

Estudios clínicos: Consistieron en la observación de síntomas dos veces al día.

Estudios anatomopatológicos macroscópicos: Observación y registro de las lesiones de los órganos y tejidos *in situ*.

También se realizó estudio de prevalencia de leptospiras en órganos de madres y crías que sobrevivieron al reto, mediante siembra de hígado y riñón en medio de cultivo Tween-Alb. (6) e incubación a 28 °C durante 14 días.

Gráfico 1. Evaluación por ELISA del título de anticuerpos en hámsters (madres y crías)



Al no obtenerse aislamiento de leptospiras en riñones de madres vacunadas y sus crías, se corrobora el establecimiento

de un nivel de protección adecuado en los animales vacunados. Además, el hecho de no observar abortos, ni

El reto de las madres vacunadas y no vacunadas con 10 000 DL₅₀ de cepas virulentas de *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok* (7) mostró que en las primeras no se registraron abortos ni muertes durante el período de gestación, con protección total de sus crías. Esto evidencia el establecimiento de una inmunidad que las protege tanto de la muerte como de la posibilidad del aborto (determinado este último por la invasividad del germen en la fase de leptospiremia), mientras que el 100% de madres no inmunizadas murieron como resultado del reto con los tres serovares estudiados. El serovar *L. canicola* produjo un 33,3% de abortos (6 crías abortadas); el serovar *L. copenhageni* un 100% (17 crías abortadas) y el serovar *L. mozdok* un 66,6% (11 crías abortadas). No se logró la protección de ninguna de sus crías. La muerte fetal, el aborto y una esterilidad temporal, pueden ocurrir en el transcurso de una infección activa, así como el retardo en la concepción (8).

Los resultados serológicos que se obtuvieron mediante ELISA (Gráfico 1) demuestran el poder inmunogénico de la vacuna, comprobado; sin embargo, la técnica de microaglutinación no evidenció respuesta de anticuerpos aglutinantes. No obstante, existió un 100% de protección en las crías de madres vacunadas y no retadas, lo que demuestra la existencia de inmunidad pasiva y permite inferir que los niveles de anticuerpos aglutinantes no guardan relación con la protección; otros investigadores han obtenido resultados similares (9). El incremento del título de anticuerpos después del reto que se observó en las madres vacunadas, se debe a que éste funciona como una dosis de recuerdo.

El cultivo de hígado y riñón de madres no inmunizadas y sus crías resultó positivo, en tanto que en las madres inmunizadas y sus crías resultó negativo.

malformaciones en las crías procedentes de madres vacunadas, brinda los posibles primeros indicios de ausencia de efecto teratogénico de la vacuna antileptospirósica polivalente vaxSPIRAL.

Los resultados muestran la inducción de un nivel de protección adecuado por la vacuna vaxSPIRAL en los animales

inmunizados, al no observarse aislamientos de leptospira en cultivo de riñones de los animales vacunados y retados que sobrevivieron. Se demuestra, además, la transferencia de inmunidad a la descendencia.

Referencias

1. Martínez RS. Algunas consideraciones sobre el comportamiento epidemiológico de la leptospirosis humana en Cuba. Instituto de Medicina Tropical. La Habana, 1991.
2. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO off set. Publication No 67 Geneva, 1982.
3. Oliva R, Infante JF, González M, *et al.* Pathological-Clinical Characterization of Leptospirosis in a Golden Syrian Hamster Model. *Arch. Med. Res.* 1994; 25(2):165-170.
4. Reed LJ, H Muench. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27:493-497.
5. Cole JR.; Sulser Gr, Pursell AR. Improved microtechnique for the microscopic agglutination test. *Appl. Microbiol.* 1973; 5:65-69.
6. Ellinghausen HC, Mc. Cullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes, fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 1965; 26: 45-51.
7. Minimum Requirements of Weil's Disease and Akiyami Combined Vaccine (Japan) 1993. Report of Discussions of the WHO Working group on Leptospirosis Vaccine Development and Vaccinology Nagoya. Japan 26-27 March 1993.
8. Ratnan S. A Manual on Leptospirosis. SR. Publications, 1994.
9. Shenberg E, Torten M. A new leptospiral vaccine. I. Development of vaccine from leptospira grown in a chemically defined medium. *J. Infect. Dis.* 1973; 128: 642-646.

Mother-offspring protection study in golden Syrian hamsters vaccinated with the leptospiral vaccine vaxSPIRAL

Abstract

The aim of the present work was to study the possible protection conferred by the leptospiral vaccine vaxSPIRAL to the offspring of vaccinated female hamsters. The mothers and their offspring were immunologically studied through ELISA and Microagglutination Test. Studies of prevalence in organs and challenge assays were also carried out. Golden Syrian hamsters of both sexes (males only for breeding purpose), weighing 60-80 g were used. They were intramuscularly immunized with a single dose of 0,5 mL of the polyvalent antileptospire vaccine vaxSPIRAL. Blood samples to perform the serological tests were taken before the vaccination and the challenge. Two weeks after the animals immunization were intraperitoneally challenged with different doses (100, 1000 and 10 000 LD50) of highly virulent strains of *Leptospira interrogans*, serovars *canicola*, *coepnageni* and *mozdok*. The offspring was challenged at 13, 22, 24, 31, 34 and 35 days old with the same strains, but 10 LD50. The samples of livers and kidneys for cultures were taken from survivors and recently dead animals. Results showed that the whole offspring of vaccinated mothers survived while all young hamsters coming from non-immunized mothers died. Although there was an evident protection, the Microagglutination test did not demonstrate agglutinating antibodies. However, ELISA test evidenced antibodies in mothers as well as in the offspring.

Key words: Protection, leptospirosis, hamster, mother-offspring, vaccine, vaxSPIRAL