

Vacuna Antileptospirósica Trivalente adsorbida para Uso Humano. Primer ensayo evaluativo de reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos

Marta González, Mariela Naranjo, Yoandra Rodríguez, Yanín Bebelagua, Reynaldo Oliva, Niurka Batista, Irma González, Luis Izquierdo y Gustavo Sierra.

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

La vacuna antileptospirósica trivalente para uso humano, vax-SPIRAL, adsorbida a un gel de hidróxido de aluminio como adyuvante, una vez completados satisfactoriamente sus estudios preclínicos fue evaluada en un primer ensayo en voluntarios adultos en cuanto a reactogenicidad e inmunogenicidad, este fue un requisito establecido internamente por el grupo que investigó y desarrolló la vacuna para evaluar antes de iniciar los estudios clínicos independientes, por tratarse de la primera vacuna antileptospirósica de células enteras inactivadas que además está adyuvada. Fueron registradas las reacciones locales y los síntomas generales durante tres días de forma activa después de la aplicación de la primera y la segunda dosis; el seguimiento posterior de la reactogenicidad se hizo de forma pasiva en el modelaje establecido. La respuesta humoral se evaluó mediante las técnicas de Microaglutinación (MAT) y ELISA, mientras que la presencia de anticuerpos protectores se evaluó mediante un ensayo de protección pasiva en hámsters, retados con 10 000 DL₅₀ de *Leptospira canicola*, *Leptospira copenhageni* y *Leptospira mozdok*. La técnica de Western Blot se realizó con el suero de las personas vacunadas frente a antígenos celulares de los serovares antes descritos. La fracción gamma del suero de los individuos vacunados y de los placebos se obtuvo mediante precipitación etanólica y se evaluó su efectividad en la inmunoterapia de la leptospirosis por *L. mozdok* en hámsters. El estudio clínico evidenció la inocuidad del producto evaluado y los resultados obtenidos mediante ELISA y MAT evidenciaron su poder inmunogénico, demostrándose seroconversión en el grupo de personas vacunadas por ambos métodos. La vacuna evaluada fue capaz de inducir anticuerpos protectores y eficaces en la terapia de la leptospirosis en hámsters. El suero de personas vacunadas reconoció fundamentalmente fracciones de 38,5; 35,2 y 30,5 Kd.

Palabras claves: Leptospirosis, vacuna humana, ensayo clínico, inmunogenicidad, reactogenicidad

Introducción

Los estudios preclínicos de la vacuna antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL fueron desarrollados en los modelos animales adecuados para cada estudio. En el modelo hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) se demostró el poder inmunógeno y protector de la variante adsorbida, comprobándose la inducción de anticuerpos mediante el ensayo ELISA y la Microaglutinación (MAT). Se demostró además que los anticuerpos inducidos eran protectores en el ensayo de reto de animales vacunados, frente a 10 000 DL₅₀ de cepas altamente virulentas de los serovares implicados en la vacuna. Otro elemento importante que caracterizó el producto lo constituyó su inocuidad, evaluada en dos modelos animales, el ratón OF1 y el curiel Duncan Hartley, demostrándose mediante los ensayos de toxicidad a dosis única y repetida la inocuidad del mismo. Se demostró además que vax-SPIRAL resultó inocua en los estudios de inmunotoxicidad en hámsters al evaluar su efecto sobre órganos inmunocompetentes como bazo, timo y médula ósea (1). El documento presentado al Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), las presentaciones ante el Comité de Expertos del Programa de Vacunas de Cuba y todas las consultas realizadas, concluyeron satisfactoriamente con

el dictamen de que los resultados preclínicos permitían el inicio de la fase clínica.

Sobre la base de todos los resultados anteriores y satisfechas las consultas pertinentes quedaba, al grupo que investigó y desarrolló la vacuna, la preocupación de que vax-SPIRAL era la primera y la única vacuna antileptospirósica de células enteras inactivadas que además estaba adsorbida a un gel de hidróxido de aluminio como adyuvante y estabilizador y se decidió realizar un ensayo en un grupo de voluntarios adultos sanos como requisito adicional de seguridad antes de iniciar la serie de estudios clínicos independientes en otras instituciones y población en general. El estudio se llevó a cabo con voluntarios provenientes de los laboratorios de *Leptospira*, la División de Modelos Animales e Histopatología y otras áreas de investigaciones del Instituto Finlay, previo consentimiento informado y chequeo médico. El objetivo principal del estudio fue asegurarnos adicionalmente de la inocuidad de la vacuna en humanos y aprovechar el ensayo para estudiar la respuesta inmune inducida, la dinámica de anticuerpos ante el esquema propuesto, y ver el comportamiento de las diferentes técnicas de laboratorio de evaluación de la respuesta inmune en humanos por primera vez ante una inmunización con vax-SPIRAL.

Materiales y Métodos

Diseño del Estudio. Veinticuatro voluntarios adultos sanos de 22 a 45 años de edad, trabajadores del Laboratorio de Leptospira, de la División de Modelos Animales y de otras áreas de investigaciones del Instituto Finlay fueron enrolados en el estudio previo chequeo médico, exámenes hematológicos y verificación de no presentar signos ni síntomas de procesos agudos infecciosos o alérgicos en el momento de la vacunación. Con el objetivo de detectar de inmediato cualquier reacción asociada con la vacuna, el estudio se diseñó como un *Open-Label Trial*, es decir, un ensayo "a rótulo abierto" donde se conocía quién recibía la vacuna y quién placebo, aunque la asignación individual se hizo por una tabla de números aleatorios, correspondiéndole finalmente vacuna a 14 y placebo a 10 voluntarios. (Este desbalance se debe al desenrolamiento de 4 voluntarios por razones de salud y de trabajo fuera de provincia). Es decir, se trata de un estudio clínico en voluntarios "a rótulo abierto" pero controlado con un grupo placebo y con asignación aleatoria de la vacuna o el placebo respectivamente.

Consentimiento informado. Los voluntarios enrolados en el estudio recibieron previamente información oral y escrita sobre la leptospirosis en general y sobre el desarrollo de las vacunas en este campo y en particular sobre todos los detalles de la vacuna que sería objeto de estudio, el diseño del mismo, el placebo y las posibles reacciones y molestias que podían sufrir y el carácter estrictamente voluntario de su enrolamiento y derecho a abandonar el estudio en cualquier momento. Todos los voluntarios firmaron una carta de consentimiento.

Vacuna empleada. Vacuna trivalente que contiene los serovares *Leptospira canicola*, *Leptospira copenhageni* y *Leptospira mozdok* adsorbida en gel de hidróxido de aluminio, vax-SPIRAL, lote 4001. La composición es la siguiente:

<i>L. canicola</i>	100 -160 x 10 ⁶ células /mL
<i>L. copenhageni</i>	100 -160 x 10 ⁶ células /mL
<i>L. mozdok</i>	100 -160 x 10 ⁶ células /mL
Gel de Hidróxido de Aluminio (Alhydrogel [®])	2 mg / mL
Timerosal	0,1 mg / mL
Tampón Fosfato Salino (TFS) .Cantidad suficiente para 1 mL	

Placebo. Constituido por:

Gel de Hidróxido de Aluminio (Alhydrogel [®])	2 mg / mL
Timerosal	0,1 mg/mL
TFS	Cantidad suficiente para 1 mL.

Dosis y esquema de inmunización. Cada voluntario recibió dos dosis de 0,5 mL por vía intramuscular profunda en el músculo deltoides, con un intervalo de 6 semanas entre dosis.

Evaluación clínica. Especial atención se prestó a la observación especializada de la reactogenicidad; los voluntarios aunque no fueron ingresados en ninguna instalación hospitalaria fueron chequeados activamente cada 6 horas durante los primeros tres días después de la aplicación de la primera y segunda dosis. Los parámetros evaluados fueron: estado general; temperatura (°C), cefaleas, náuseas, síntomas locales como inflamación, dolor, eritema, induración, escozor y cualquier otro síntoma general o local referido y/o comprobado. Después de las 72 horas el seguimiento de la reactogenicidad fue por el reporte pasivo de cada voluntario dos veces al día durante la primera semana después de la primera y segunda dosis y en cualquier momento que se les presentara una molestia hasta 3 semanas después. Adicionalmente fueron aprovechados los momentos de toma de muestras de sangre para la dinámica de anticuerpos para interrogar sobre síntomas y signos y para observar el sitio de la inoculación.

Procedimientos serológicos. Se extrajeron 5 mL de sangre venosa semanalmente durante 8 semanas a un grupo de 5 de los voluntarios vacunados y placebo con vistas a la definición de la dinámica de anticuerpos inducida en las personas vacunadas, mientras que el resto se muestreó al tiempo 0, 2, 6 y 8 semanas. El suero se separó por centrifugación a 3 500 rpm durante 10 minutos y conservó a - 20 °C hasta su uso. Los títulos de aglutininas de los sueros se determinaron mediante MAT (2), usando como antígenos cepas virulentas de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*, ajustadas a una concentración de 100 x 10⁶ células/mL. La dilución inicial de trabajo de los sueros para esta técnica fue de 1:2, efectuándose diluciones dobles seriadas en TFS. Como controles positivos se consideraron sueros de referencia. Los títulos se definieron como la mayor dilución que obtuvo un 50% de aglutinación. Todas las muestras de suero se evaluaron el mismo día, con el mismo lote de antígeno y por la misma persona, con vistas a evitar errores debidos al factor humano y variabilidad antigénica.

La respuesta humoral se evaluó también mediante un sistema ELISA de células fijadas a la placa (1), y se utilizó para ello un antígeno trivalente de células inactivadas y lavadas de *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*, ajustadas a una concentración de 200 x 10⁶ células/mL y un conjugado anti-IgG humana peroxidasa (Sigma).

Ensayo de Protección Pasiva. Se preparó una mezcla de sueros tomados 15 días después de aplicada la primera dosis, con vistas a comprobar en este tiempo la existencia de una inmunidad que fuera capaz de proteger a los animales inmunizados pasivamente contra 10 000 DL₅₀ de cepas altamente virulentas de los serovares antes mencionados, resultado este encontrado al evaluar la vacuna en hámsters. Para este ensayo se emplearon 30 hámsters sirio dorado con un peso promedio de 60-90 g, provenientes del Centro para la Producción de Animales

de Laboratorio (CENPALAB). A 15 hámsters se les inoculó por vía intraperitoneal 1 mL de la mezcla de sueros provenientes de personas vacunadas y los 15 restantes 1 mL de la mezcla de sueros de los placebos. Las 24 horas después los hámsters se separaron en grupos de a 5 por caja y se les retó con 10 000 DL₅₀ de cada serovar incluido en la vacuna (3). Los animales se observaron durante 14 días (4). Después de transcurrido este tiempo los sobrevivientes se les sacrificó; muestras de riñón se sembraron en medio Tween-Albúmina (5), incubándose a 28 °C durante cuatro semanas.

SDS-PAGE. Se prepararon lisados de células de *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok* (6). Para la electroforesis se utilizó un sistema discontinuo (7), empleándose un gel separador al 12,5% de acrilamida. Las muestras se corrieron a 100 mA durante 6 horas, tiñéndose el gel con una solución de azul brillante de Commassie R 250 (Sigma), diluido en 10% de ácido acético (Merck) más 10% Metanol (Merck). El patrón de peso molecular (PM) empleado estuvo constituido por una mezcla de proteínas de 67, 43, 25, 18 y 14 Kd.

Determinación de los pesos moleculares. Para ello se empleó un programa de análisis de datos, mediante el cual se obtuvo la curva de regresión ajustada a partir de los valores del logaritmo de los PM de los patrones y las movilidades electroforéticas calculadas. El PM de las diferentes bandas visualizadas en la electroforesis y las reconocidas en el Western Blot, se calculó por interpolación en la curva de regresión obtenida.

Western Blot. Esta técnica se desarrolló atendiendo a las condiciones reportadas previamente en la literatura (8).

Los sitios libres de la nitrocelulosa fueron saturados con leche descremada (Oxoid) al 5% en Tampón Tris Salino (TTS). Los antígenos de *Leptospira* transferidos se detectaron después de la incubación de la nitrocelulosa con una mezcla de sueros de individuos vacunados con dos dosis de vax-SPIRAL, que se obtienen 15 días después de aplicada la segunda dosis, y posterior reacción con el conjugado anti-IgG humana peroxidasa (Sigma). La reacción fue visualizada mediante la tinción con 5 mg de 4-Cl-1 naphtol (Sigma) diluido en 1 mL de metanol (Merck) más 24 mL de TTS y 15 ul de H₂O₂ (Merck).

Purificación de la fracción gamma del suero de personas vacunadas y placebos. La purificación de la fracción gamma de personas vacunadas y placebos se lleva a cabo mediante precipitación etanólica (9).

Inmunoterapia. Se inocularon 25 hámsters con 10 000 DL₅₀ de *L. mozdok*, separados en 5 grupos y cada caja contiene 5 animales. En el momento de la aparición de los primeros síntomas clínicos cada grupo recibió un tratamiento distinto como se describe en la Tabla 1. Los animales se observaron durante 14 días y se registró el porcentaje de mortalidad.

Análisis Estadístico. Se realizaron comparaciones de proporciones usando las pruebas chi-cuadrado y Fischer, ambos de una sola cola implementados en el paquete Epi-Info Versión 3.0.

Tabla 1 Tratamiento aplicado a cada grupo de hámsters infectados con 10 000 DL₅₀ de *L. mozdok*

Grupo	Tratamiento*
I	Gentamicina (0,5 mg / Kg de peso)
II	Gentamicina (0,5 mg / Kg de peso) más fracción gamma de personas vacunadas (1 mg)
III	Fracción gamma de personas vacunadas (1 mg)
IV	Fracción gamma de personas no vacunadas (1 mg)
V	Ninguno

* Se aplicó cada 8 horas durante 24 horas

Resultados

De acuerdo con los resultados reflejados en la Tabla 2 el síntoma más frecuente que se observó en el grupo de voluntarios vacunados fue el dolor local, tanto después de la aplicación de la primera como de la segunda dosis. El segundo síntoma a tomar en consideración fue el escozor, aunque la frecuencia es relativamente baja. Los

resultados en el grupo placebo mostraron que el dolor local se reportó en el 38% de los casos después de la primera dosis y en el 57% de los casos después de la segunda dosis, según se aprecia en la misma Tabla. Si comparamos los resultados obtenidos en el grupo de vacunados con respecto al grupo placebo se puede asumir que el dolor local pudiera deberse en gran medida al efecto del adyuvante (10). Aunque para el eritema y el

escozor se compara ocurrencia nula con 14,29; 21,43 y 6,7% respectivamente en 2da y 1ra dosis al ver el número de individuos implicados, tampoco se puede detectar significación estadística para esa diferencia entre receptores de vacuna y placebo.

En el grupo de voluntarios se suspendió la aplicación de la segunda dosis a un voluntario que presentó molestias después de la primera dosis consistente en malestar general y sensación de fatiga; después se comprobó en

este caso el desarrollo de un síndrome gripal por lo que quedó claro que la vacuna no fue causa de la reacción.

Todas las reacciones presentadas fueron leves, transitorias, con pocas horas de evolución y completamente reversibles sin tratamiento alguno, y sin dejar secuelas. La vacuna resultó segura, inocua, bien tolerada y no causó molestias distintas a las esperadas para una vacuna absorbida como otras del esquema normal de inmunizaciones.

Tabla 2. Parámetros clínicos evaluados en voluntarios vacunados con vax-SPIRAL y placebos, después de la aplicación de la primera y segunda dosis

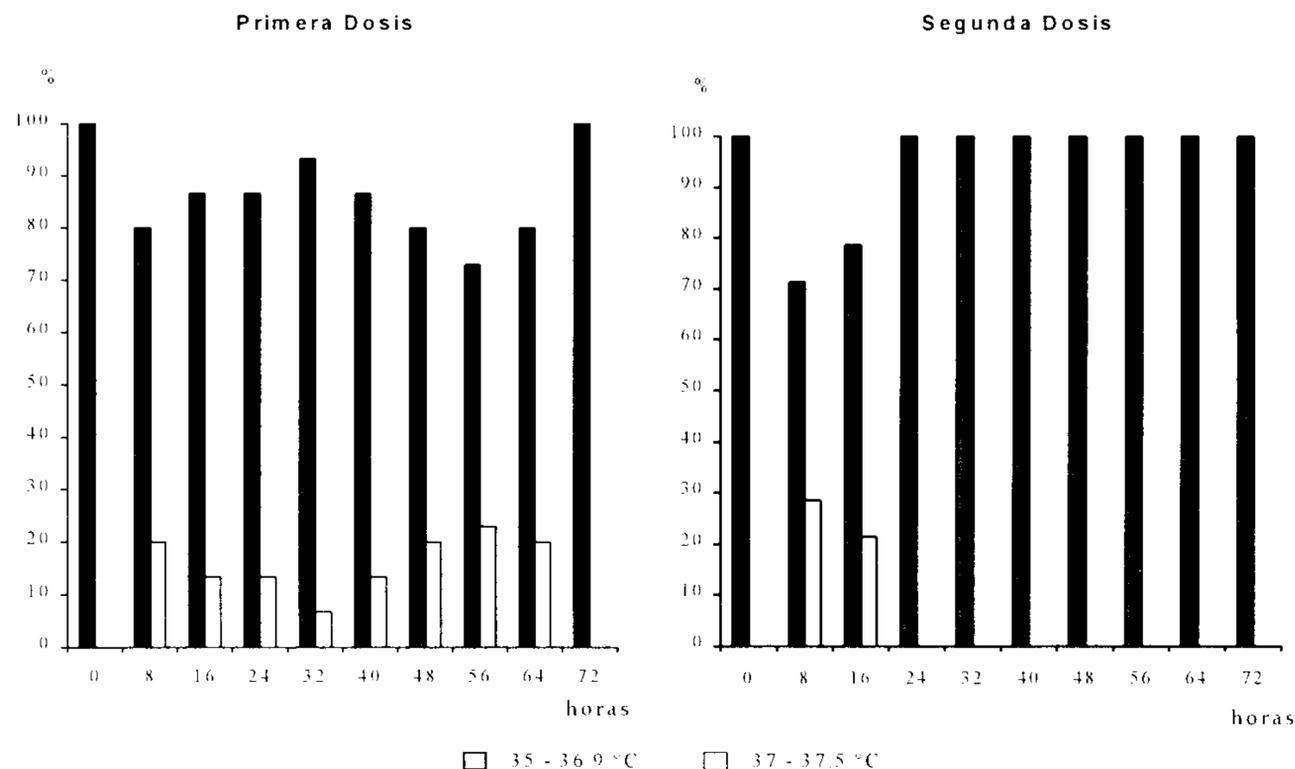
Parámetros clínicos evaluados	% de casos observados después de cada dosis de vacuna			
	Vacunados		Placebos	
	Primera dosis n = 15	Segunda dosis n = 14	Primera dosis n = 10	Segunda dosis n = 10
Dolor local	40,00*	64,00*	38	57
Eritema	0	14,29	0	0
Escozor en el punto de inoculación	6,7	21,43	0	0
No reaccionaron	60	36	62	43

* Dolor local ligero mantenido no más de 72 horas .

En el Gráfico 1 se muestran los resultados relativos al comportamiento de la temperatura corporal en el grupo de voluntarios vacunados. No se observaron

temperaturas superiores a los 37,5 °C, lo cual no se considera fiebre. Las temperaturas registradas en el grupo placebo no fueron superiores a 36,8 °C.

Gráfico 1. Comportamiento de la temperatura corporal en voluntarios vacunados, durante 72 horas después de aplicadas la primera o segunda dosis de vax-SPIRAL



En cuanto a la definición de la dinámica de anticuerpos mediante la utilización del sistema ELISA se puede apreciar un aumento de la respuesta de anticuerpos con la aplicación de la segunda dosis, con respecto a los niveles observados ante la respuesta primaria,

poniéndose de manifiesto con este resultado el poder inmunógeno de la vacuna evaluada (Gráfico 2). Un comportamiento semejante se observa en el Gráfico 3, donde aparecen reflejados los resultados obtenidos de la respuesta individual de cada voluntario vacunado.

Gráfico 2. Resultados de la respuesta inmune humoral IgG, evaluada mediante un sistema ELISA, en el grupo de personas no vacunadas y vacunadas con vax-SPIRAL

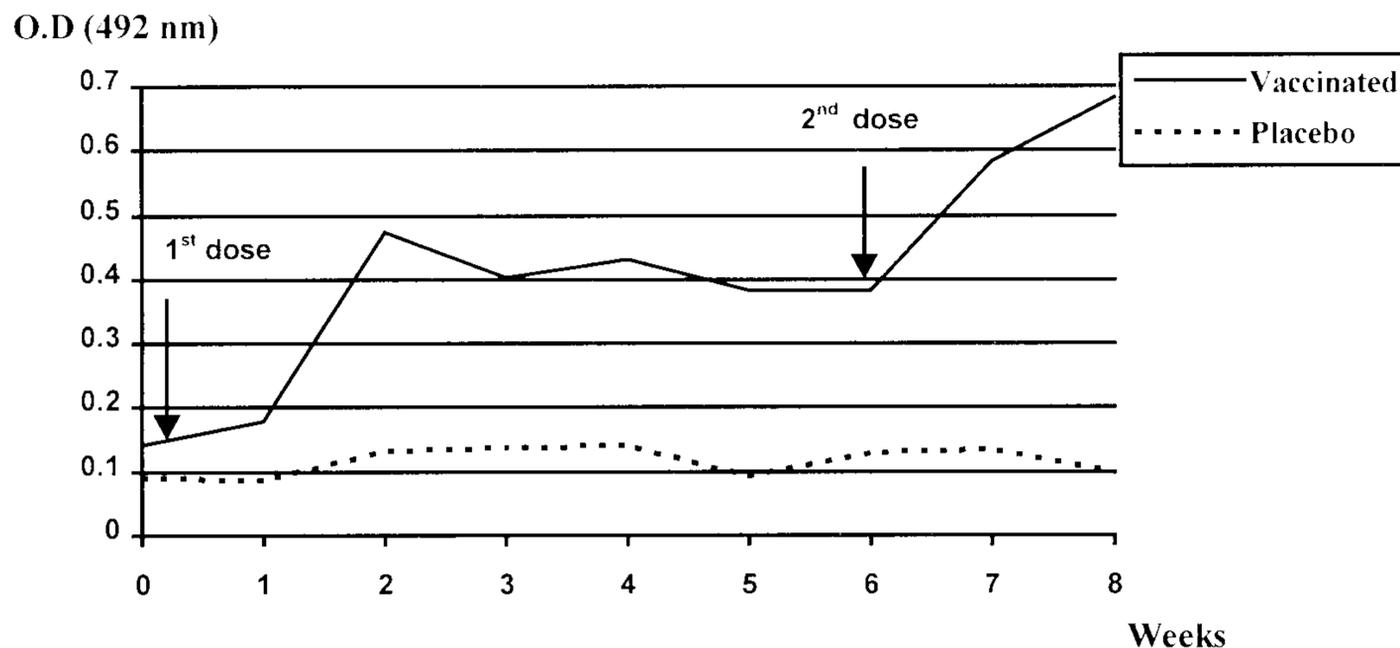
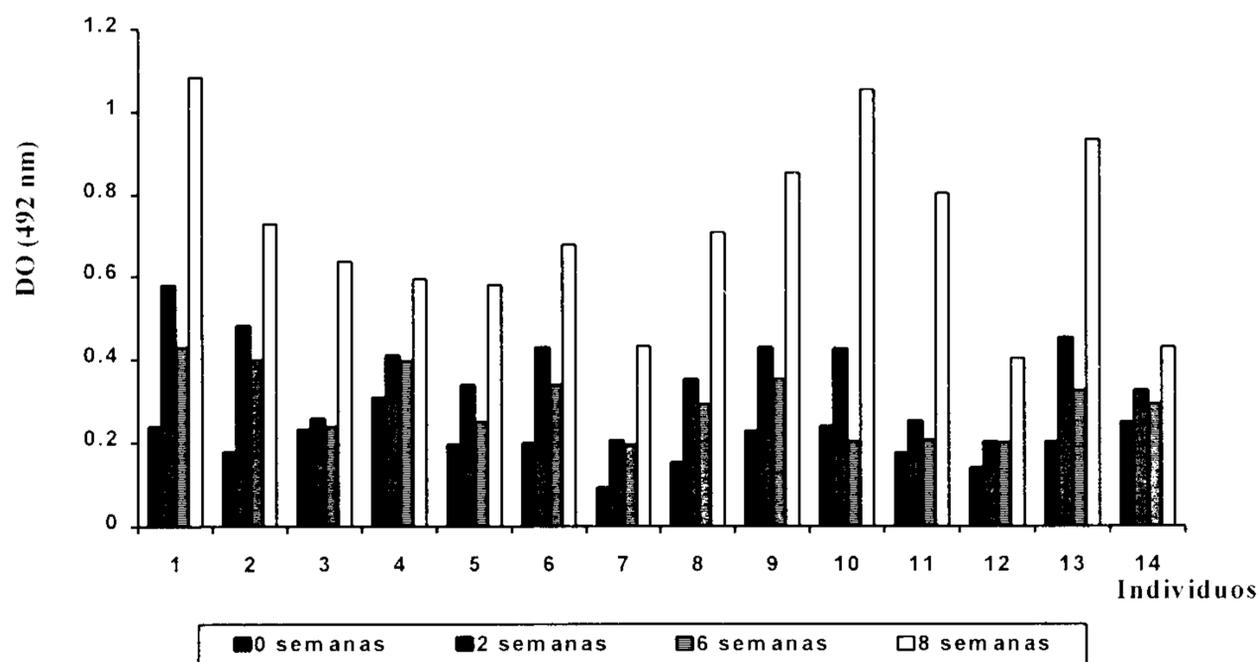


Gráfico 3. Respuesta humoral en un grupo de voluntarios vacunados con vax-SPIRAL



La evaluación de la respuesta humoral mediante el ensayo de microaglutinación (Tabla 3) mostró la presencia de aglutininas en el suero de las personas vacunadas, observándose el efecto positivo de la aplicación de una segunda dosis sobre el título de anticuerpos detectados, coincidiendo con los resultados

obtenidos mediante la técnica ELISA al menos en el patrón general de seroconversión, aunque no en la intensidad, pues los títulos por MAT son por lo general bajos. La correlación con una respuesta protectora parece ser mejor con los anticuerpos medidos por ELISA y con la protección pasiva en el modelo de hámster.

Tabla 3. Reacciones serológicas en voluntarios vacunados, evaluadas mediante el ensayo de Microaglutinación

Individuo No.	Antes de la primera dosis	Título			15 días después de la segunda dosis		
		15 días después de la primera dosis					
		<i>canicola</i>	<i>copenhag</i>	<i>mozdok</i>	<i>canicola</i>	<i>copenhag</i>	<i>mozdok</i>
1	0	ND	ND	ND	0	1:16	1:32
2	0	1:16	1:8	0	1:32	1:32	1:8
3	0	ND	ND	ND	1:16	1:16	1:16
4	0	ND	ND	ND	1:16	1:16	1:16
5	0	1:8	1:8	1:8	1:32	1:32	1:32
6	0	0	0	0	1:16	1:16	0
7	0	0	0	1:4	1:8	1:8	1:4
8	0	1:8	0	0	1:8	0	0
9	0	1:8	1:4	1:4	1:32	1:4	1:16
10	0	1:8	0	0	1:16	1:4	1:8
11	0	ND	ND	ND	1:32	1:32	1:16
12	0	0	0	0	1:32	1:16	1:16
13	0	0	1:8	1:8	1:8	1:16	1:16
14	0	0	0	0	1:16	1:16	1:32

ND: No desarrollado

Tabla 4. Resultados del ensayo de protección pasiva en el modelo hámster sirio dorado, usando las muestras de suero de personas vacunadas y placebos tomadas 15 días después de la primera dosis

Grupo	No. de animales	Serovar	Confrontación*	
			% Mortalidad	% Sobrevida
Vacunado	5	<i>canicola</i>	20	80
	5	<i>copenhageni</i>	20	80
	5	<i>mozdok</i>	0	100
Placebo	5	<i>canicola</i>	100	0
	5	<i>copenhageni</i>	100	0
	5	<i>mozdok</i>	100	0

* Los animales fueron confrontados con 10 000 DL₅₀ de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*.

Significación estadística en protección a favor de vacunados: Para serovar *L. canicola*: P= 0.048
 Para serovar *L. copenhageni*: P= 0.048 Para serovar *L. mozdok*: P= 0.008

Se demostró además que la respuesta humoral arriba descrita estaba caracterizada por la presencia de anticuerpos protectores, debido a que los animales inmunizados pasivamente con el suero hiperinmune de personas vacunadas fueron capaces de sobrevivir al reto con 10 000 DL₅₀ de cepas altamente virulentas de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*; se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia de 80, 80 y 100, respectivamente (Tabla 4).

Los tubos incubados durante cuatro semanas con muestras de riñón de los animales que sobrevivieron al reto, protegidos con el suero de los voluntarios vacunados, no mostraron crecimiento bacteriano alguno y las muestras de los animales controles que murieron por leptospirosis masiva sí presentaron crecimiento de leptospiras en sus cultivos, lo cual demuestra la no prevalencia de leptospirosis en el órgano de los animales protegidos y avala la potencia de la vacuna en ensayo, traducida esta en la naturaleza protectora de la respuesta inmune inducida en los voluntarios vacunados (5). Atendiendo a la naturaleza del principio activo de esta vacuna, constituido por células enteras de los serovares

L. canicola, *L. copenhageni* y *L. mozdok*, el conocimiento de qué componentes de éstas representan los antígenos inmunodominantes y por tanto aquellos hacia los que se ha dirigido fundamentalmente la respuesta en los voluntarios vacunados, representa un elemento importante dentro de nuestros resultados. El SDS-PAGE de los antígenos celulares de los serovares anteriormente descritos muestran patrones electroforéticos semejantes, donde más que diferencias debidas a la presencia de uno u otro antígeno se podría hablar de diferencias en cuanto a la magnitud en la expresión de los mismos (Figura 1). La evaluación, mediante la técnica de Western Blot, de aquellos antígenos reconocidos más fuertemente por el suero de personas vacunadas mostró como resultado fundamental tres fracciones localizadas en las regiones de los 30,5; 35,2 y 38,5 Kd, observándose además un débil reconocimiento de otras fracciones (Figura 2).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la gamma hiperinmune demostraron su efectividad en la inmunoterapia de la leptospirosis en hámsters infectados experimentalmente con 10 000 DL₅₀ de *L. mozdok* (Tabla 5).

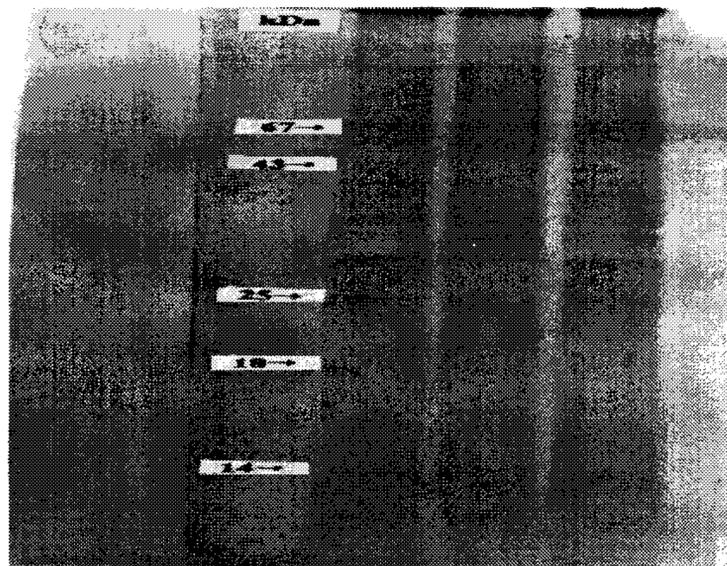


Figura 1: SDS-PAGE de antígenos celulares de *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok* separados en un gel lineal al 12,5% y teñidos con azul brillante de Coomasie.

1) *L. canicola* 2) *L. copenhageni* 3) *L. mozdok*. Los números a la izquierda muestran los pesos moleculares de las proteínas patrones utilizadas.

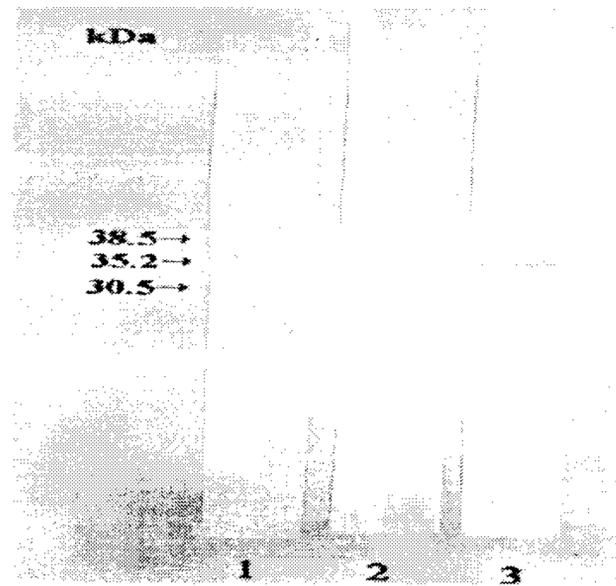


Figura 2: Western Blotting de antígenos celulares de *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok* frente a una mezcla de sueros de individuos vacunados con dos dosis de vax-SPIRAL. Se utilizaron muestras de suero tomadas 15 días después de aplicada la segunda dosis.

1) *L. canicola*, 2) *L. copenhageni*, 3) *L. mozdok*. Las flechas a la izquierda muestran los pesos moleculares de las fracciones reconocidas con mayor intensidad.

Tabla 5. Resultados de la quimioterapia e inmunoterapia en hámsters infectados con 10 000 DL₅₀ de *L. mozdok*

Grupo	No. de animales	Tratamiento	Frecuencia (horas)	Dosis (mg/Kg)	Muertes
I	5	Gentamicina	Cada 8	0,5	1
II	5	Gentamicina	Cada 8	0,5	0
		+			
		Gamma hiperinmune	3 después	1	
III	5	Gamma hiperinmune	Cada 8	1	0
IV	5	Gamma no hiperinmune	Cada 8	1	5
V	5	Control	-	-	5

Discusión

Las vacunas conocidas hasta el momento, como medida profiláctica contra la leptospirosis humana, son suspensiones celulares mono o polivalentes, donde cada serovar está representado por concentraciones iguales o superiores a 100×10^6 células/dosis de vacuna, con esquemas de vacunación de dos dosis con intervalo entre ellas de 7 a 21 días (12,13,19, 23 y 24).

La utilización de vacunas de células enteras puede potenciar la respuesta inmune, ya que llevan en sí mismas componentes de membranas altamente inmunogénicos. Sin embargo las vacunas conocidas hasta el momento contra la leptospirosis humana confieren una protección relativamente corta, de 6 meses a 1 año (12, 23, 24). Durante la fase investigativa de laboratorio se consiguió establecer un proceso de inactivación y de tratamiento post-inactivación que conserva con un daño mínimo los antígenos celulares principales de la leptospira y sobre esta base fue posible

disminuir la cantidad de antígeno celular en nuestra vacuna con respecto a otras, este factor está a favor de la disminución de las posibles reacciones vacunales derivadas de la carga antigénica. Otro factor que diferencia nuestra vacuna de otras es que vax-SPIRAL es la única adyuvada para uso humano (14, 15); este factor ha tenido dos ventajas: la primera que nuestra formulación es estable a 4 °C por más de 2 años después de producida y la adsorción es el factor principal de esta estabilidad adicional y la otra ventaja ha sido la potenciación de la respuesta humoral y su mayor duración demostrada en estudios comparados preclínicos (1) con formulaciones no adyuvadas y que en este primer estudio en humanos ha sido corroborado al obtenerse una cinética de anticuerpos con seroconversión medida por MAT y ELISA superior a otras vacunas y con una calidad protectogénica también superior evidenciada por el ensayo de protección pasiva con suero de vacunados en el modelo de hámster.

El grupo de voluntarios vacunados con vax-SPIRAL no mostró reacciones adversas sistémicas ni locales serias a la vacuna, solamente se presentaron reacciones ligeras como febrícula y dolor leve en el sitio de la inoculación, pudiendo atribuírsele este último síntoma en gran medida al adyuvante empleado, pudiendo hacer esta inferencia sobre la base de los resultados obtenidos con el grupo que recibió el placebo que estaba constituido esencialmente por el gel de $Al(OH)_3$ usado como adyuvante a igual concentración; en este grupo hubo aproximadamente la misma proporción de dolor local que en el grupo de vacunados; los otros síntomas como eritema y escozor sí parecen propios de la respuesta inducida por los antígenos vacunales. En todos los casos fueron reacciones leves, transitorias, que no requirieron de tratamiento y que no dejaron secuelas. La vacuna tiene una excelente tolerancia y seguridad, es tan inocua y poco reactogénica como otras vacunas adsorbidas de amplio uso.

Según se puede apreciar en los resultados que aparecen reflejados en los Gráficos 2 y 3, la vacuna resultó ser inmunógena y se logra un efecto *booster* con la aplicación de la segunda dosis. Los títulos de aglutininas obtenidos son relativamente bajos, todo lo cual puede estar en correspondencia con la disminución en la concentración de antígenos empleada por serovar y por dosis de vacuna. La evaluación de la vacuna Shen-Tor (11,13), tanto en hámsters como en humanos demostró que la misma induce títulos bajos de aglutininas, reportando los autores que en *Leptospira* es factible encontrarse bajos títulos de aglutininas con un alto nivel de protección. Otros autores reportan que títulos de aglutininas entre 1:4 y 1:100 pueden proporcionar un buen nivel de protección (16, 17, 18). No obstante, la evaluación de la protección inducida en el suero de personas vacunadas mediante el ensayo de inmunización pasiva en hámsters nos permitió demostrar que, a pesar de los bajos títulos de aglutininas encontrados, se logró un nivel de protección adecuado, representado esto por un 80% de sobrevivencia frente al reto con los serovares *canicola* y *copenhageni* y un 100% de sobrevivencia frente al serovar *mozdok*, todo esto frente a un cruento reto de 10 000 DL_{50} .

En los resultados serológicos por MAT se demostró que la respuesta a los tres serovares que componen la vacuna no fue la misma dentro de un mismo individuo ni entre individuos diferentes; siendo estos resultados semejantes a los reportados por otros autores en humanos (12,19).

Los niveles de seroconversión obtenidos después de la aplicación de las dos dosis de vacuna fueron de un 85,7%, resultados estos que superan a los obtenidos en el grupo de voluntarios vacunados con la vacuna líquida israelí Shen-Tor (12), que fueron de un 57% y a los de la vacuna soviética evaluada en nuestro país, con la cual se obtuvo un 17,3% de seroconversión (19). Debe tenerse en cuenta sin embargo que este estudio es con un pequeño número de voluntarios y que su objetivo no era

medir seroconversión sino iniciar los estudios de reactogenicidad y seguridad y obtener información preliminar sobre inmunogenicidad. De todas formas los títulos obtenidos por MAT fueron en general bajos, lo cual no tiene gran importancia, pues no esperábamos correlación de estos títulos con la protección inducida por la vacuna sino solamente un indicador de "movimiento" de la respuesta mediada por anticuerpos.

La quimioterapia ha resultado ser el tratamiento por excelencia ante el establecimiento de la leptospirosis, aunque se han reportado los posibles usos de una gamma hiperinmune obtenida de personas vacunadas en la inmunoterapia de esta enfermedad (20, 21). Los resultados que aparecen en la Tabla 5 muestran que la fracción gammaglobulina obtenida mediante extracción etanólica a partir del plasma de los voluntarios vacunados, demostró ser eficaz en la inmunoterapia contra la leptospirosis en hámsters experimentalmente infectados con *L. mozdok*. Estos resultados avalan la continuidad de los trabajos encaminados a la obtención de una gamma hiperinmune de personas vacunadas y nos permiten inferir su posible uso en la inmunoterapia de esta enfermedad en humanos. (Estudios en curso han ampliado esta evidencia a otros serovares).

Conociendo que la vacuna cubana contra la leptospirosis humana es inmunogénica, no reactogénica y que induce una respuesta potencialmente protectora en las personas vacunadas, se hace necesario conocer hacia qué componentes de estos microorganismos está dirigida esta respuesta. Los resultados obtenidos mediante la técnica de Western Blott evidencian el reconocimiento de tres fracciones de 38,5; 35,2 y 30,5 Kd, respectivamente, en los tres serovares evaluados. Las bandas de 30,5 y 35 Kd pudieran corresponder a la proteína flagelar de 34,5-35 Kd y a la proteína principal de la membrana externa de aproximadamente 32 Kda. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores (22), al evaluarse la respuesta inmune en personas vacunadas, donde las principales bandas proteicas reconocidas fueron las de 32 Kda y el doblete 34,5-35, además de otros componentes. Debe tenerse en cuenta que el Western Blotting no es una técnica que pueda por sí sola identificar todas las proteínas que reconoce un antisuero en particular, hay algunas proteínas y sobre todo determinantes antigénicos importantes que se pierden durante el proceso para esta técnica. Por eso nuestros estudios actuales la complementan con otras. Estos resultados representan las premisas de un objetivo fundamental: la identificación de aquellas biomoléculas responsables en la inducción y establecimiento de un estado inmune contra la leptospirosis en humanos.

Agradecimientos. Al Dr. W. Terpstra y al Dr. Hans Korver del Laboratorio de Referencia WHO, Tropical Royal Institute, Amsterdam, Holanda, por suministrarnos gentilmente los antisueros de referencia utilizados en la técnica de Microaglutinación.

Referencias

- González M, Infante JF, Estévez L, Hidalgo C, González I, Yi R, Oliva R, Reyes A, Sierra G, Pérez V, Duarte C. A trivalent antileptospirotic vaccine against human leptospirosis. Preclinical evaluation of safety, immunogenicity and potency in animal models. En fase de revisión en la Rev. *Archives of Medical Research*.
- Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the microscopic agglutination test. *Applied Microbiology*. 1973; 5:65-69.
- Reed and Muench. A simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am.J Hyg.* 1938; 27:493-497.
- Russell FB, Russell CJ. Humoral Immune response of cattle vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccines. *Am. J Vet Res.* 1978; 39(7):1109-1114.
- Ellinghausen HC, Mc.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.
- Brown JA, Lefebvre RB, Pan MJ. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 1991; 59(5):1772-77.
- Laemmli, NK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- Burnette, WN. "Western Blotting". Electrophoretic transfer of protein from Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 1980; 112:192-20.
- Kistler P, Nitschmann H, Bjorling H. Plasma fractionation methods used in Sweden. *Vox Sang.* 1962.7:414. Tomado de *Avances en Inmunoterapia Galguera M, Campa HC, Sierra GG Cubanacan SA.* 1987.
- Gupta, R.K., C.K. Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine.* 1993; 11:293-306.
- Torten M, Shenberg ET, Richter CB, Neuman P, Klingberg MA. A new leptospiral vaccine for use in man. II Clinical and serologic evaluation of a field trial with volunteers. *J Infect. Dis.* 1973; 128:624-646.
- Chen Ting-zuo. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann. Immunol Hung.* 1986; 26:125-151.
- Shenberg ET. A new leptospiral vaccine I. Development of a vaccine from leptospira grown in a chemically defined medium. *J Infect Dis.* 1973; 128:642-646.
- Grupo Científico de la OMS. *Coadyuvantes Inmunológicos.* Ginebra 6-10 de Octubre de 1975; ISBN 92 4 320595 1 Printed in Switzerland pag 7-12.
- Rajesh KG, George RS. Adjuvants for human vaccines- current status, problems and future prospects. *Vaccine.* 1995; 13 (14):1263-1276.
- Adler B, Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J Hyg.* 1980; 84:1-10.
- Burnstein I, Bramel RG, Jenson J. Vaccination of swine with a *Leptospira pomona* bacteria. *Vet. Med.* 1957; 52:58-61.
- Plesko T, Hruzik J, Sasvari K. The first experience with the polyvalent anti-leptospiral vaccine in our conditions. *Bratisl. Lek. Listy.* 1967; 47:209-218.
- Cruz RP, Rodríguez PH, López CA, Atienzar EC, Abreus JU, Aldana FA. Reactogenicidad a la vacuna humana antileptospirotica en Cuba. *Rev.Cub.Hig.Epid.* 1986; 24(4):407-412.
- Faine S. *Guidelines for the control of leptospirosis.* WHO off set. Geneva, 1982. (Publication No. 67).
- Yagovkin EA, Vachaev BF, Kostina NI., Malaescheva OV. Immunobiological properties of new vaccines against icterohaemorrhagiae leptospirosis for human. *Abstracts of the VII European and IX USSR Leptospirosis Research Conference,* February 20-22. Moscow; 1991:75.
- Chapman AJ, Everard COR, Faine S, Adler B.. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. *Epidemiol. Infect.* 1990; 107:143-155.
- WHO. Minimum Requirements of Weil's Disease and Akiyami Combined Vaccine. *Report of Discussions of the WHO working group on leptospirosis vaccine development and vaccinology.* Nagoya, Japan, 26-27 March. 1993. (ANNEX II/9-13)
- Korea Green Cross Corporation. Information on *Leptospira Vaccine- KGCC, Quality Controls.* July; 1994.

Adsorbed trivalent antileptospirotic vaccine for human use. First trial for the evaluation of reactogenicity and immunogenicity in voluntary adults

Abstract

The human trivalent antileptospirotic vaccine, vax-SPIRAL, adsorbed in Al(OH)₃ gel which represents the first adjuvated vaccine of inactivated cells, was evaluated in adult volunteers after preclinical testing, regarding reactogenicity and immunogenicity as a prerequisite before independent clinical trials. The local and systemic symptoms were actively recorded during the first 72 hours after the application of the first and second dose with further passive assessment of these parameters. The humoral specific response was evaluated by the techniques of Microagglutination (MAT) and ELISA. The presence of protective antibodies was evaluated by means of a passive protection assay in hamsters challenged with 10 000 LD₅₀ of *Leptospira canicola*, *copenhageni* and *mozdok*. Western blot studies were carried out with sera of vaccinated people against cellular antigens of the three serovars. The gamma fraction of the sera from vaccinees and placebo subjects was obtained by ethanolic precipitation and evaluated in the treatment of the experimental infection of hamsters with *L. mozdok*. The study proved the safety of the product and a good immunogenicity with a high seroconversion rate measured by MAT and ELISA methods in the vaccinated group. The induction of protective antibodies was demonstrated with the use of the model of experimental infection in hamsters. The sera of vaccinees identified bands of 38.5, 35.2 and 30.5 Kd.

Key words: Leptospirosis, human vaccine, clinical trial, immunogenicity, reactogenicity.

Recibido: 4/7/97

Aprobado: 21/11/97