

Respuesta IgG inducida en población de riesgo vacunada con vax-SPIRAL (Vacuna Antileptospirósica Trivalente: *canicola*, *copenhageni* y *mozdok*)

Yoandra Rodríguez, Marta González, Xenia Ferriol, Roger Medina, Rolando Ochoa, Morelia Baró, Marlene Armesto, Arturo Talavera y Gustavo Sierra.

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

E-mail: yoandrarod@finlay.edu.cu

La respuesta IgG sérica inducida por la aplicación de la vacuna antileptospirósica trivalente (*canicola*, *copenhageni*, *mozdok*) vax-SPIRAL fue evaluada en dos poblaciones de riesgo del municipio San José de Las Lajas, La Habana, Cuba. Fueron determinados los niveles de anticuerpos IgG antes y después de la vacunación mediante ELISA, empleando como antígeno de recubrimiento células completas inactivadas de los serovares componentes de la vacuna. Se definió como criterio de respuesta el incremento en dos veces de la concentración de IgG posterior a la vacunación. La vacuna indujo una respuesta de anticuerpos IgG similar para los tres serovares en ambas poblaciones, obteniéndose entre 63,77% y 70,04% de respuesta. Se observó una elevada seroprevalencia de anticuerpos contra los tres serovares antes de la vacunación. Se obtuvieron además diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de IgG antes y después de la vacunación en las dos poblaciones. Estos resultados constituyen la primera demostración de la capacidad inmunogénica de vax-SPIRAL en población de riesgo expuesta y una evidencia de que la respuesta está influenciada, entre otros factores, por el contacto previo con el germen.

Palabras claves: *Leptospira interrogans*, inmunogenicidad, respuesta humoral, ELISA IgG, vax-SPIRAL.

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica ampliamente distribuida, causada por una variedad de espiroquetas común en los roedores y otros mamíferos, pertenecientes a la especie *Leptospira interrogans* (1).

Esta enfermedad puede ser controlada a través de la vacunación. Sin embargo, a pesar de su incidencia creciente en el hombre, esta práctica no se ha aplicado de forma amplia aunque se ha utilizado con buenos resultados en Italia, Israel, Japón, Rusia y China (2-5). En Cuba, debido al incremento de la morbilidad por leptospirosis, se desarrolló una bacterina trivalente a partir de cepas autóctonas de los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio. Los estudios preclínicos y clínicos realizados hasta el momento han demostrado su seguridad, inmunogenicidad y capacidad protectora (6-9). En la actualidad se está usando para grupos de riesgo en nuestro país bajo la marca comercial vax-SPIRAL (9).

Dada la necesidad de profundizar en los estudios relacionados con la capacidad inmunogénica de vax-SPIRAL en humanos, nos propusimos evaluar la respuesta mediada por anticuerpos IgG contra los

serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* en población de riesgo vacunada.

Materiales y Métodos

Poblaciones: El estudio se realizó con 109 voluntarios de la Universidad Agraria de La Habana (UAH) y 69 voluntarios del Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA), de ambos sexos entre 21 y 55 años de edad, que constituían un personal de riesgo dado su perfil ocupacional (estudiantes y trabajadores veterinarios). Ambas poblaciones están ubicadas en áreas del municipio San José de las Lajas, La Habana, Cuba, caracterizadas por una alta incidencia de la enfermedad.

Vacunación: Los voluntarios fueron vacunados por vía intramuscular con dos dosis de vax-SPIRAL (Lote 9009) de 0,5 mL cada una, con intervalo de seis semanas.

Muestras: Se realizaron dos extracciones de sangre, una antes de la vacunación (T0) y la otra 21 días después de la segunda dosis (T1). El suero fue separado por centrifugación y conservado a -20 °C hasta su evaluación.

Evaluación serológica: Fueron determinados los niveles de anticuerpos IgG en suero contra los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* mediante ELISA. Para

ello se preparó un suero estándar, común para los tres serovares, a partir de la mezcla de sueros de individuos vacunados con vax-SPIRAL, que al ser cuantificado con respecto a un estándar primario preparado de igual forma en el Laboratorio de Inmunoquímica de DACTA dio 31 U IgG/mL para *canicola*, 12 U IgG/mL para *copenhageni* y 58 U IgG/mL para *mozdok*. El procedimiento seguido para el ELISA se describe a continuación. Las placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar) fueron recubiertas con 100 µL con el antígeno de células completas de cada serovar por separado. Luego de la incubación toda la noche a 50 °C hasta total desecación, se lavaron cuatro veces con Tampón Fosfato Salino (TFS) pH 7,2-7,4 - 0,05% de Tween 20 y se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 3% en TFS. Posteriormente fueron aplicados por duplicado 100 µL de las muestras de suero diluidas 1:200 en TFS/ leche descremada 3%/ Tween 20 0,05%, las diluciones doble seriadas del suero estándar desde 1:100 hasta 1:3200 y el suero control positivo, incubándose las placas 1 h a 37 °C. A continuación siguieron los pasos de lavados como se indicó arriba, incubación 1 h a 37 °C con el conjugado anti IgG humana -peroxidasa (Sigma) diluido 1:15 000 en el mismo diluyente de las muestras y lavados. Por último las placas fueron reveladas con 100 µL por pocillo de Tampón Sustrato (10 mg ortofenilendiamina, 10 mL de tampón citrato pH 5, 10 µL de H₂O₂ 30%), se detuvo la reacción a los 30 min con 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 2 N y se procedió a la lectura de la D.O a 492 nm en un lector

de ELISA. El cálculo de las concentraciones de las muestras se realizó empleando el programa ELISA del CDC de Atlanta (10), el cual se basa en la interpolación de los valores de D.O de las muestras en la curva estándar utilizada en el propio sistema.

Teniendo las concentraciones de IgG antes y después de la vacunación se calculó la relación entre ellas (T1/T0), tomando como criterio de respuesta que la misma fuera igual o superior a 2.

Procedimiento estadístico: Se calcularon los Intervalos de Confianza al 95% de las concentraciones de IgG antes y después de la vacunación. Para determinar si existían diferencias entre las mismas se aplicaron las pruebas T de Student y la de los Rangos de los Signos para p<0,05.

Resultados

Analizando la respuesta de acuerdo con el aumento de la concentración de IgG posterior a la vacunación en dos o más veces, observamos que hubo un comportamiento similar en las dos poblaciones estudiadas (Tabla 1). En la UAH el 70,04%, 64,22% y 66,06% de los individuos respondieron a *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* respectivamente, mientras que los porcentos de respuesta en el CENSA fueron de 66,67% para *canicola* y *copenhageni* y 63,77% para *mozdok*. Es evidente por lo tanto la similitud en la respuesta a los tres serovares.

Tabla 1. Evaluación por ELISA de la respuesta de anticuerpos IgG contra los serovares componentes de vax-SPIRAL®

| Población | T1/T0* | <i>canicola</i> | | <i>copenhageni</i> | | <i>mozdok</i> | |
|-----------|--------|-----------------|-------|--------------------|-------|---------------|-------|
| | | No. | % | No. | % | No. | % |
| UAH | ≥2 | 77 | 70,04 | 70 | 64,22 | 72 | 66,06 |
| n=109 | <2 | 32 | 29,36 | 39 | 35,78 | 37 | 33,94 |
| CENSA | ≥2 | 46 | 66,67 | 46 | 66,67 | 44 | 63,77 |
| n=69 | <2 | 23 | 33,33 | 23 | 33,33 | 25 | 36,23 |

* Concentración de IgG 21 días después de la segunda dosis / concentración de IgG antes de la vacunación.

En la Tabla 2 se muestra el comportamiento de los niveles de IgG contra los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* antes de la vacunación. Podemos observar la elevada seroprevalencia de anticuerpos contra los tres serovares en ambas poblaciones, ya que alrededor del 40% de los individuos de la UAH y el 70%

de los del CENSA presentaban concentraciones altas de IgG antes de la vacunación. Debido a la variabilidad encontrada en la población definimos como valores iniciales bajos de IgG aquellos que se encontraban por debajo del punto medio de la curva estándar y como valores altos los encontrados por encima.

Tabla 2. Respuesta de anticuerpos IgG contra los serovares componentes de vax-SPIRAL antes de la vacunación

| Serovar | [IgG] T0 | UAH | | CENSA | |
|--------------------|-------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| | | No. | % | No. | % |
| <i>canicola</i> | Alta | 52 | 47,71 | 49 | 71,01 |
| | Baja | 57 | 52,29 | 20 | 28,29 |
| <i>copenhageni</i> | Alta | 45 | 41,28 | 51 | 73,91 |
| | Baja | 64 | 58,72 | 18 | 26,09 |
| <i>mozdok</i> | Alta | 41 | 37,61 | 54 | 78,26 |
| | Baja | 68 | 62,39 | 15 | 21,74 |

Tabla 3. Respuesta a la vacunación con relación a los niveles de IgG iniciales

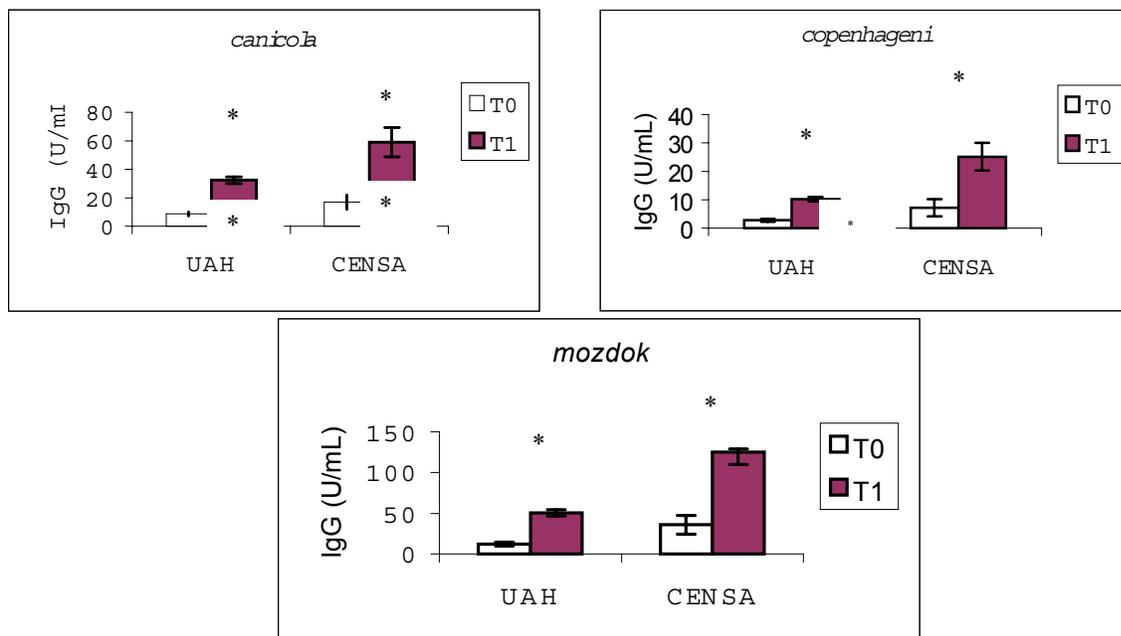
| Serovar | IgG T0 (U/mL) | Porcentaje (%)* | |
|--------------------|---------------|-----------------|--------------|
| | | UAH | CENSA |
| <i>canicola</i> | Alta | 96,49 | 90,00 |
| | Baja | 42,31 | 57,14 |
| <i>copenhageni</i> | Alta | 84,38 | 94,44 |
| | Baja | 33,33 | 56,86 |
| <i>mozdok</i> | Alta | 85,29 | 100 |
| | Baja | 34,15 | 55,56 |

*: Porcentaje de personas con relación T1/T0 ≥ 2

Se analizó entonces cómo era la respuesta después de la vacunación en estos dos grupos de personas, lo cual se refleja en la Tabla 3. En la mayoría de los individuos con concentraciones de IgG iniciales bajas, la relación T1/T0 fue mayor de 2, no así en los que tenían concentraciones iniciales altas.

En la Figura 1 se muestran los valores promedios y los intervalos de confianza al 95% de las determinaciones de IgG por ELISA de los sueros de los voluntarios antes y después de la vacunación, distribuidas por serovar. En ambas poblaciones se produjo un incremento significativo en la respuesta de anticuerpos IgG posterior a la vacunación para los tres serovares.

Figura 1. Respuesta IgG contra los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* antes (T0) y después (T1) de la vacunación medida por ELISA. Las barras representan la media geométrica de las concentraciones de IgG. *Diferencias estadísticas significativas (p<0,05) determinadas por la prueba t de Student y la prueba de los rangos de los signos para muestras pareadas.



Discusión

Estudios previos (11-16) han demostrado que uno de los mecanismos que participa en la inmunidad a la leptospirosis es la producción de anticuerpos aglutinantes y opsonicos dirigidos fundamentalmente contra determinantes antigénicos presentes en la membrana externa del microorganismo, como son el LPS y proteínas.

Es por ello que para evaluar la respuesta inducida por un preparado vacunal contra esta enfermedad, ya sea para uso humano o veterinario, se ha usado con frecuencia la técnica de Microaglutinación (2, 3, 6, 7, 17). Mediante ella pueden medirse anticuerpos aglutinantes que pertenecen fundamentalmente a la clase IgM, aunque se ha descrito que los anticuerpos de la clase IgG manifiestan también esta propiedad (1, 11, 12, 17, 18). Por otro lado, es conocido el papel fundamental que desempeñan los anticuerpos IgG en la protección contra esta enfermedad debido a su capacidad opsonizante (19-23). Por tanto, es de suma importancia que una vacuna sea capaz de inducir una adecuada respuesta de IgG específica.

Las vacunas que existían hasta la década del 90 como medida profiláctica contra la leptospirosis humana, eran suspensiones celulares mono o polivalentes sin adyuvante. En general los estudios han indicado que confieren una protección corta, de 6 meses a un año, e inducen generalmente bajos títulos de anticuerpos aglutinantes, lo cual puede no estar correlacionado con el nivel de protección establecido (2-5). En 1999 se reportó el desarrollo de un ensayo clínico en Rusia con una nueva vacuna inactivada y concentrada que mostró ser altamente inmunogénica (89,8% a 98,3% de seroconversión) al ser administrada en dosis única de 0,5 mL (24).

Los estudios preclínicos de vax-SPIRAL demostraron que la formulación empleada fue capaz de potenciar la respuesta inmune humoral y establecer un buen patrón de memoria inmunológica en el modelo animal Hámster Sirio Dorado (9). Además, un estudio preliminar realizado en un pequeño grupo de voluntarios evidenció la capacidad inmunogénica de esta vacuna, demostrándose la inducción de anticuerpos IgG medidos por ELISA (6). Estos resultados constituyeron las premisas para la realización de este estudio en población de riesgo.

Como vax-SPIRAL es una preparación trivalente de células completas, por lo cual funciona como un complejo multiantigénico, y además no se conoce con certeza hacia qué antígenos está dirigida la respuesta en las personas vacunadas, se decidió utilizar un sistema ELISA que empleara para el recubrimiento los mismos antígenos

celulares componentes de la vacuna, el cual fue estandarizado y validado con anterioridad. Por tanto mediante este ELISA estamos cuantificando los anticuerpos IgG dirigidos contra todos los componentes potencialmente inmunogénicos de la célula de *Leptospira*, que podrían ser proteínas de la membrana externa, LPS, proteínas flagelares, etcétera.

Los resultados obtenidos demostraron que esta vacuna fue capaz de inducir anticuerpos IgG contra sus tres serovares componentes, obteniéndose niveles de respuesta similares para ambas poblaciones. Este hecho es de suma importancia ya que demuestra la capacidad de la formulación empleada para inducir una respuesta múltiple.

Los porcentajes de repuesta estuvieron entre el 63,77 y 70,04%. Estos fueron superiores a los reportados en un estudio inicial realizado en un grupo de voluntarios donde se obtuvo un 34,2% de seroconversión por ELISA (7). Las diferencias obtenidas pueden estar dadas a que en dicho estudio se empleó para el recubrimiento el llamado antígeno "TR" obtenido a partir de *L. Patoc*. Se trata de un antígeno género específico, de una cepa diferente a las empleadas en la vacuna, por demás de especie diferente (*L. Biflexa*) que es saprófita (26). Por tanto consideramos que no se trata de una adecuada preparación antigénica para evaluar la respuesta a vax-SPIRAL.

Tampoco es ideal la utilización del antígeno celular para diferenciar la respuesta a cada uno de los serovares porque anticuerpos dirigidos contra componentes proteicos pueden mostrar reactividad cruzada entre serogrupos (25). No obstante, es una aproximación más verídica a lo que ocurre con la respuesta inmune inducida por la vacuna. Además preparaciones similares, pero con células completas sonicadas han sido utilizadas para evaluar respuesta a la vacunación (27).

Es de destacar el elevado nivel de seroprevalencia observado en ambas poblaciones. Este hallazgo es lógico si tenemos en cuenta que la leptospirosis es una enfermedad endémica en nuestro país, caracterizada por la gran circulación del microorganismo. Por tanto, era de esperar que en población de riesgo y expuesta existiera un nivel de anticuerpos específicos inducidos contra los serovares que circulan en esa región. Estos niveles fueron incluso superiores en la población del CENSA, lo cual puede deberse a una mayor exposición de esta población.

En las dos poblaciones la respuesta individual fue extremadamente variada, por lo cual fue imposible establecer un patrón determinado. Sin embargo, pudo

establecerse con certeza que existían diferencias entre aquellos individuos con concentraciones de IgG bajas o elevadas antes de la vacunación, pues la mayoría de los primeros respondieron a la vacunación según el criterio de respuesta definido, no así los segundos. El problema que se presenta entonces para analizar la respuesta a vax-SPIRAL según la Relación "T1/T0", que es una expresión empleada comúnmente para definir seroconversión, es que una buena parte de las personas con un nivel de IgG inicial elevado, no presentarán incrementos en la respuesta que llegue a la duplicación, lo cual no significa necesariamente que no estén protegidos.

Por ello sería importante establecer una correlación entre la respuesta mediada por anticuerpos IgG y los niveles de protección establecidos. Actualmente en nuestro laboratorio se encuentran en curso estudios de protección pasiva en hámsters que permitirán definir concentraciones de IgG que puedan corresponderse con una respuesta protectora satisfactoria.

Además, puede resultar de interés el estudio de la respuesta después de la primera dosis de la vacuna para ambos grupos de personas, porque en el caso de personal con contacto previo esta estaría funcionando como un "booster" y por tanto los incrementos en las concentraciones de IgG luego una segunda aplicación de la vacuna pudieran no ser tan elevados.

No obstante, al realizar el análisis estadístico de las distribuciones antes y después de la vacunación es evidente que existe un "movimiento" significativo de la respuesta IgG que puede ser atribuido a la vacuna.

Por todo lo antes expuesto podemos concluir que se evidenció la capacidad inmunogénica de vax-SPIRAL en las poblaciones de riesgo estudiadas. No descartamos que en la respuesta integral a la vacuna también participen mecanismos de respuesta celular que serán objeto de estudio en futuros trabajos.

Referencias

- 1- Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. Geneva: WHO, 1982 (Publication No. 67).
- 2- Iagovkin EA. The improvement of immunobiological preparations against leptospirosis. *Microbiol Epidemiol Immunobiol.* 1990; 2:47-51
- 3- Torten M, Shenberg E. A new leptospiral vaccine for use in man II. Clinical and serological evaluation of a field trial with volunteers. *J Infect Dis.* 1993; 128:647-51.
- 4- Chen Ting-zuo. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann Immunol.* 1986;26:125-51.
- 5- World Health Organization. *Report of the WHO working group on leptospirosis vaccine development and vaccinology.* Nagoya, Japan. 26-27 March, 1993.
- 6- González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, González I, Izquierdo L y Sierra G. Vacuna antileptospirosica trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. *VacciMonitor.* 1997; 6 (12):2-10.
- 7- Martínez RS. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop.* 1998, 50 (2):159-66.
- 8- Martínez RS. Evaluación parcial de la efectividad de la vacuna contra la Leptospirosis humana (vax-SPIRAL) en grupos de riesgo de la Provincia de Holguín- Cuba. *Braz J Infect Dis.* 1997; 1(1).
- 9- Ministerio de Salud Pública de Cuba. vax-SPIRAL. Vacuna antileptospirosica trivalente (*canicola, copenhageni, mozdok*) para uso en humanos. Registro Médico Sanitario 846. 1998.
- 10- Plikaytis BD. Programa ELISA. Center for Diseases Control., Atlanta. GA. USA. 1986.
- 11- Jost BH, Adler B, Vinh T and Faine S. Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol.* 1989; 29:115-120.
- 12- Chapman AJ, Adler B and Faine S. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar . *J Med Microbiol.* 1988; 25:269-278.
- 13- Chapman AJ, Faine S and Adler B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalent hardjo/pomona leptospiral vaccine. *FEEMS Microbiol Immunol.* 1990; 64:111-18.
- 14- Chapman AJ, Everard COR, Faine S and Adler B Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. *Epidemiol Infect.* 1991; 107:143-55.
- 15- Cinco M, Delneri D y Banfi E. Immunodominant antigens recognized by the human immune response to infection by organism of the species *Leptospira interrogans* serogroup Australis. *FEEMS Microbiol Immunol.* 1992; 89:287-98.
- 16- Gitton X, Daubié MB, André F, Ganière JP y André-Fontaine G. Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs. *Vet Microbiol.* 1994; 41:87-97.
- 17- Bolin CA, Cassells JA, Zuerner RL, Trueba G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. *Am J Vet Res.* 1991; 52:1639-1643.
- 18- Midwinter A, Faine S and Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immunconjugates from *Leptospira interrogans*. *J Med Microb.* 1990; 33:199-204.
- 19- Banfi E, Cinco M, Bellene M and Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction

- between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol.* 1982; 128:813-816.
- 20- Vinh T, Adler B and Faine S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis. *Pathology.* 1982; 14:463-468.
- 21- Farrelly HE, Adler B, Faine S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J. Med Microbiol.* 1987; 23:1-7.
- 22- Jost BH, Adler B and Faine S. Reaction of monoclonal antibodies with species specific determinants in *Leptospira interrogans* outer envelop. *J Med Microbiol.* 1988; 27:51-57.
- 23- Heath SE and Johnson R. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1994; 205 (11):1518-1523.
- 24- Ikoef VN et al. The evaluation of the reactogenicity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. *Zbl Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1999; 4:39-43.
- 25- Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere J P, André-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine.* 2001; 19:86-94.
- 26- Terpstra WJ, Ligthart GS and Shoone GJ. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Zbl Bakt Mikrobiol Hyg.* 1980; 247:400-405.
- 27- Adler B, Murphy AM, Locarnini SA and Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobuline M and immunoglobuline G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1980; 11:452-457.

IgG immune response induced by vaccination with the trivalent (*canicola*, *copenhageni*, *mozdok*) leptospiral vaccine vax-SPIRAL in risk population

Abstract

The humoral immune response induced by the trivalent (*canicola*, *copenhageni*, *mozdok*) leptospiral vaccine, vax-SPIRAL, was studied in two risk populations of San José de Las Lajas, Cuba. The levels of IgG antibodies were evaluated before and after vaccination by means of ELISA, using whole-cell antigens of serovars mentioned above for coating the microtiter plates. Two-fold increasing of the IgG concentration after vaccination was defined as response criterion. The vaccine induced a similar IgG response in both populations, between 63,77% and 70,04%. A high seroprevalence of IgG antibodies against the three serovars was observed. Significant statistical differences ($p < 0,05$) were obtained between IgG levels before and after vaccination. These results are the first demonstration of the immunogenicity of vax-SPIRAL in people expose at risk and evidence that the response may be influenced, among other factors, by the previous contact with the micro-organism.

Keywords: *Leptospira interrogans*, Immunogenicity, Humoral immune response, IgG ELISA, vax-SPIRAL