

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Respuesta serológica por ELISA y MAT en voluntarios cubanos vacunados con vax SPIRAL®

Lic. Ana Margarita Obregón,¹ Dr. Gerardo Martínez,² Dr. Raydel Martínez,³ Dra. Alina Llop,⁴ Lic. Islay Rodríguez,⁵ Téc. José Rodríguez⁶ y Dra. Carmen Fernández⁷

RESUMEN

Se estudió la seroconversión en 408 individuos vacunados y 135 placebo, incluidos en 2 ensayos clínicos de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Se estudiaron 2 dosis vacunales y 5 esquemas. Seroconvirtieron de 38 vacunados (Fase I), 11 (29 %) por MAT y 12 (32 %) por ELISA, y de 33 placebo, 2 (6 %) y 3 (9 %) respectivamente. En la Fase II de 68 vacunados (dosis de 0,25 mL) y de 65 (dosis de 0,50 mL), seroconvirtieron 21 (31 %) y 16 (25 %) por ELISA respectivamente, por MAT 9 (13 %) y 7 (11 %) individuos fueron positivos. No hubo diferencias significativas entre las dosis utilizadas. La seroconversión por MAT, en 237 individuos vacunados con diferentes esquemas, fue de 22,4 %, no existiendo diferencias significativas entre estos. En la mayoría de los individuos reactivos, se encontraron niveles de anticuerpos al menos a una de las cepas vacunales. Se recomendó, buscar y evaluar otros métodos para demostrar *in vivo*, el nivel de protección de esta vacuna.

Palabras clave: Leptospirosis, inmunología, diagnóstico, test serológicos; vacunas, test de ELISA, Cuba.

A finales del año 1994 comienzan los estudios para la producción nacional de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana: vax SPIRAL®. Esta medida dirigida por las autoridades de salud pública y el gobierno cubano, fue adoptada dada la aparición durante este año, de un total de 2 828 nuevos casos y 52 fallecidos (MINSAP. Dirección Nacional de Epidemiología. Programa de Control y Prevención de la Leptospirosis humana. Habana. Cuba. 1998).

En los ensayos clínicos realizados en el Instituto "Pedro Kourí" (IPK), fueron desarrollados protocolos de investigación, que incluían a voluntarios vacunados con las cepas: mozdok 108, copenhageni 169 y canicola 87 de *Leptospira*

interrogans, y a un grupo placebo que recibieron solamente una suspensión integrada por: gel de hidróxido de aluminio, tiomersal y solución salina de fosfatos (PBS) en cantidades suficientes para 0,5 mL. Se estudió la inmunogenicidad de las fases de reactogenicidad (I) e inmunogenicidad (II).

En el Laboratorio Nacional de Referencia de *Leptospira* del IPK, fueron estudiados los sueros de 543 voluntarios, con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad a diferentes dosis y esquemas. Se evaluó la seroconversión en los individuos vacunados y placebo usando las técnicas de ELISA y MAT. Las dosis evaluadas fueron de 0,25 y 0,50 mL. Fueron evaluados 5 esquemas (vacuna rusa con intervalo de 7 d entre dosis de 2,5 mL,

¹ Máster en Ciencias en Bacteriología Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

² Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Agregado.

³ Especialista de II Grado en Epidemiología. Investigador Auxiliar.

⁴ Especialista de II Grado en Microbiología. Académica Titular.

⁵ Máster en Ciencias en Bacteriología Micología. Licenciado en Microbiología. Investigador Agregado.

⁶ Técnico en Investigación y Servicio.

⁷ Máster en Microbiología. Médico Veterinaria. Investigadora Auxiliar.

vacuna cubana con dosis de 0,5 mL a intervalos de 4, 6, 8 y 10). Las extracciones de sangre, correspondientes a estos momentos, fueron evaluadas por los métodos de laboratorio citados.¹

De 71 voluntarios de Fase I, 38 recibieron vacuna (Grupo I) y 33 recibieron placebo (Grupo II). Del Grupo I seroconvirtieron 11 (29 %) y 12 (32 %) mediante las técnicas de MAT y ELISA respectivamente. En el Grupo II, resultaron positivos 2 (6 %) y 3 (9 %) por MAT y ELISA. Al realizar el análisis estadístico utilizando el método de las diferencias de proporciones (Z), hubo diferencias significativas entre los porcentajes de seroconversión obtenidos en los vacunados y el grupo que recibió placebo ($p=0,01$).

De 11 vacunados, 4 casos reaccionaron al serogrupo Pomona, 3 a Icterohemorragiae y 4 individuos presentaron reacción cruzada entre los serogrupos Icterohemorragiae y Pomona, y entre Pomona y Canicola. En placebo, un caso reaccionó al serogrupo Pomona y otro presentó reacción cruzada entre Icterohemorragiae y Pomona. Se encontró un índice de coincidencia entre las técnicas de MAT y ELISA de 84,6 %.

De 133 vacunados en Fase II, seroconvirtieron 37 (28 %) por ELISA y 16 (12 %) por MAT. De 102 placebo, fueron 11 (11 %) y 3 (3 %) respectivamente. Al realizar el análisis estadístico utilizando el método de las diferencias de proporciones (Z), hubo diferencias significativas entre los porcentajes de seroconversión ($p=0,01$). Dentro de estos 133 individuos vacunados, a 68 se les aplicó la dosis de 0,25 mL, y dentro de estos 21 (31 %) seroconvirtieron por ELISA y 9 (13 %) por MAT. Otros 65 vacunados recibieron dosis de 0,50 mL, y de estos 16 (25 %) seroconvirtieron por ELISA y 7 (11 %) por MAT. Al realizar el

análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre los resultados de los vacunados con las 2 dosis de estudio. De 58 individuos placebo que recibieron la dosis de 0,25 mL, seroconvirtieron 5 (9 %) por ELISA y 2 (3 %) por MAT, de 44 placebo con dosis de 0,50 mL lo hicieron 6 (14 %) y 1 (2 %), respectivamente. Al realizar el análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre los resultados de los 2 grupos ($p=0,05$).

El índice de coincidencia entre ELISA y MAT para los individuos vacunados con dosis de 0,25 mL fue de 55,8 % y para los que recibieron 0,50 mL fue de 69 %. Al aplicar el *test* de Mc Nemar, hubo diferencias significativas entre las lecturas de las 2 técnicas. El índice de coincidencia entre ELISA y MAT para los individuos placebo que recibieron dosis de 0,25 mL fue de 90 % y para los que recibieron 0,50 mL fue de 87 %. Al aplicar el *test* de Mc Nemar, no hubo diferencias significativas entre las lecturas de las 2 técnicas.

Reaccionaron frente a los serogrupos Pomona, Icterohemorragiae y Canicola, 11, 5 y 10 vacunados, respectivamente. Frente a los serogrupos Pomona e Icterohemorragiae, lo hicieron 4 y 2 placebo. Reaccionaron 2 placebo cruzadamente frente a las cepas de los serogrupos Pomona y Canicola y Canicola e Icterohemorragiae, respectivamente.

De 237 vacunados con diferentes esquemas de inmunización, se obtuvo una seroconversión de 22,4 %. En la tabla, se observa que 3 de 15, 9 de 44, 12 de 51, 13 de 45 y 19 de 82 voluntarios fueron positivos por MAT. No hubo diferencias significativas entre los esquemas aplicados. Un total de 40, 22 y 33 individuos reaccionaron frente a los serogrupos de Icterohemorragiae, Canicola y Pomona, respectivamente.

TABLA. Seroconversión en vacunados con diferentes esquemas de inmunización

Seroconversión	Total de Casos				
	Esquema I	Esquema II	Esquema III	Esquema IV	Esquema V
Antes de aplicar la vacuna y después de aplicada la primera dosis	2	7	10	11	16
Después de aplicada la primera y segunda dosis	0	1	2	0	1
Aumento del título serológico antes y después de aplicada la primera dosis	1	1	0	2	2
Negativos	12	40	42	35	64
Total	15	49	54	48	83

La evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana, realizada en esta investigación, produjo resultados similares a los reportados durante la evaluación de esta bacterina, en Rusia y China.²⁻⁵

Los porcentajes de seroconversión de las Fases I y II, en esta investigación, son inferiores a 57 % reportado en la evaluación de la vacuna Shen Tor, de Israel. Los valores de los títulos de anticuerpos en este trabajo superaron la dilución 1:1280, estos son más elevados si se comparan con el máximo valor (1:160) alcanzado, al evaluar la vacuna israelita. Durante algún tiempo, investigadores de Israel, evaluaron la eficacia y la efectividad de la vacuna Shen Tor, y observaron que existía una buena protección en los individuos vacunados, y que la tasa de morbilidad se mantenía bien reducida. No existe por lo tanto una relación proporcional entre el título de anticuerpos y el nivel de protección de estas bacterinas. La estrategia seguida por las autoridades de salud, en esta región, fue la de vacunar por un período no menor de 5 años, evaluando la potencia del preparado vacunal, a través de la tasa de supervivencia de la población en estudio.⁶

Los estudios de protección de vacunas contra la leptospirosis humana son escasos, los que aparecen refieren a la prueba de inmunización pasiva en el hámster dorado, como el método ideal para medir el grado de protección de cada bacterina. Investigadores cubanos han cuantificado el grado de protección *in vitro* de vax SPIRAL®. Animales vacunados y retados frente a los serogrupos Icterohamorrhagiae y Canicola presentaron 80 % de protección. Sin embargo, cuando estos fueron retados frente al serogrupo Pomona la protección alcanzó 100 %.⁷

Otros investigadores no han encontrado diferencias significativas entre diferentes dosis y esquemas usados para evaluar la inmunogenicidad de preparados vacunales. Adler y otros, evaluaron dosis de 0,02, 0,05 y 0,1 mL y determinaron que el nivel de anticuerpos IgM (MAT), resultaba similar en cada evaluación.⁸

El carácter inmunogénico de las bacterinas contra la leptospirosis humana, ha sido un elemento controvertido a través del tiempo. El resultado final dependerá de la selección adecuada del método de elaboración de la vacuna y del método de medir

la inmunogenicidad. En esta investigación fue usado un ELISA de captura de anticuerpos IgM, IgG, e IgA. Este sistema ofrece como ventaja principal que expresa el título a punto final equivalente a la concentración de anticuerpos totales, lo que permitió comparar entre muestras de un mismo voluntario, el aumento significativo del nivel de inmunoglobulinas totales.¹ Se recomienda, a partir de estos resultados, buscar y evaluar otros métodos inmunológicos capaces de demostrar el nivel de anticuerpos protectores producidos por la vacuna cubana vax SPIRAL®, contra la leptospirosis humana.

SUMMARY

The seroconversion of 408 vaccinated individuals and 135 placebo included in 2 clinical trials of the Cuban vaccine against human leptospirosis was studied. 2 vaccine doses and 5 schemes were studied. Of 38 vaccinated subjects (Phase I), 11 (29 %) seroconverted by MAT and 12 (32 %) by ELISA, whereas in 33 placebo, seroconversion was observed in 2 (6 %) and 3 (9 %), respectively. In Phase II, of 68 vaccinated individuals (doses of 0.25 mL) and of 65 (doses of 0.50 mL), seroconversion was attained in 21 (31 %) and 16 (25 %) by ELISA, respectively, 9 by MAT (13 %) and 7 (11 %) were positive. There were no significant differences between the doses used. The seroconversion by MAT in 237 subjects vaccinated with different schemes was 22.4 %. No marked differences were observed between them. In most of the reactive individuals, antibody levels were found in at least one of the vaccine strains. It was recommended to search and evaluate other methods to show *in vivo* the level of protection of this vaccine.

Key words: Leptospirosis, immunology, diagnosis, serologic tests, vaccines, enzyme-linked immunosorbent assay, Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Obregón AM, Otero A, Laferté J. ELISA for detection of human leptospirosis. Rev Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89(3):365.
2. Cruz R, Rodríguez P, López C, Atienzar E, Abreus J, Aldana F. Reactogenicidad a la vacuna humana antileptospirosis en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol 1986;24(4):407-12.
3. Stephanova NA. Naturaleza de los anticuerpos en personas inmunizadas con la vacuna contra la leptospirosis. Rev Mikrobiol Epid Immunol 1982;4:93.
4. Chen Ting W. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. Ann Immunol Hung 1986;26:125-51.
5. Martínez R, Pérez A, Baró M, Díaz M, Obregón AM, Baly A, et al. Evaluación de la reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Basilian: J Infect Dis 1997;1(1):1174.
6. Torten M, Shenberg E, Richter CB, Neuman P, Klingberg M. A new leptospiral vaccine for use in man. II clinical and serological evaluation of a trial with volunteers from the WHO-PAHO and National Leptospirosis laboratory

- Reference Laboratories. Israel: Inst. for the Biological Research; 1988.p.647-9.
7. González M, González I. Vacuna antileptospirósica trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo pre clínico evaluativo de su reatogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de adultos. *Vaccinmonitor* 1997;6:12.
8. Adler B, Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J Hyg Camb* 1980;84:1-10.
- Recibido: 28 de mayo de 2003. Aprobado: 24 de noviembre de 2003.
Lic. *Ana Margarita Obregón*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: amobregon@ipk.sld.cu

CURSOS DE VERANO

ACTUALIZACIÓN EN MEDICINA TROPICAL

- **Especialidad:** Microbiología
- **Sede:** Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Autopista Novia del Mediodía, Km 6, e/Autopista Este-Oeste y Carretera Central. Arroyo Arenas, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono: 220633, Fax: 53-7-246051 y 53-7-220633. Telex: 51-1902 y 512341, E.Mail:ciipk@ipk.sld.cu.
- **Profesor principal:** Dra. Nereyda Cantelar de Francisco, Profesora Titular Adjunta, Investigadora Titular, Doctora en Ciencias Biológicas, Especialista de II Grado en Microbiología, Subdirectora Docente del IPK. Dirección particular: Calle H, #15006, e/7ma. y D, Altahabana, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. Carné de Identidad: 42022101759. Teléfono: 442406.
- **Profesor sustituto:** Dr. Juan Carlos Millán Marcelo, Profesor Auxiliar, Investigador Agregado, Especialista de II Grado en Medicina Interna, Jefe del Dpto. de Áreas Clínicas del IPK, responsable de las investigaciones clínicas de Enfermedades Infecciosas. Dirección particular: Calle F. No. 58, e/ 9 y Calzada, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. Carné de Identidad: 50031601546.
- **Dirigido a:** Médicos. Debe presentar título universitario.

Objetivos:

Al concluir, los participantes serán capaces de:

- Adquirir los conocimientos y habilidades fundamentales que les permitan conocer prevenir y tratar las principales enfermedades tropicales y los problemas de salud de sus respectivos países.

Temáticas:

- Principios de Epidemiología para el control de enfermedades y la investigación clínica.
- Generalidades en Medicina Tropical.
- Laboratorio Práctico.

Modalidad: Curso.

Fecha: Del 7-11 Julio de 2003 - Del 5 al 9 de Julio de 2004, 4-8 julio 2005

Tiempo docente: 80 horas.

Matrícula máxima: 15

Idioma: Español.

Costo de matrícula: \$ 700.00 USD