

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Respuesta de anticuerpos IgG antileptospira en individuos inmunizados con vax-SPIRAL

Lic. Islay Rodríguez,<sup>1</sup> Dra. Raydel Martínez,<sup>2</sup> Lic. Yarelys Zamora,<sup>1</sup> Téc. José Enrique Rodríguez,<sup>3</sup> Dra. Carmen Fernández<sup>4</sup> y Lic. Ana Margarita Obregón<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se aplicó un sistema ELISA cuantitativo para la detección de anticuerpos IgG en respuesta a la vacuna cubana contra la leptospirosis humana (vax-SPIRAL), a sueros de 930 voluntarios, 483 inmunizados con vax-SPIRAL y 447 con una vacuna contra la hepatitis B. Fueron estudiadas las muestras tomadas antes de comenzar el estudio, a los 21 d de aplicada la segunda dosis y al cabo del año. Se pudo observar una alta seroprevalencia de anticuerpos a los serovares vacunales antes de comenzar el estudio, un incremento al doble del valor inicial de la respuesta a los 21 d de la segunda dosis de la vacuna antileptospirósica en 45 % de los individuos, existiendo diferencias marcadamente significativas ( $p=0,000000$ ) entre ambos grupos. Se detectó respuesta a los 3 serovares leptospirales de forma similar. Al cabo del año los niveles de anticuerpos caen, sin embargo, hay 23,1 % de individuos que logran duplicar su nivel de anticuerpos respecto al momento inicial, manteniéndose la diferencia significativa con el grupo que recibió la vacuna contra hepatitis B. Se recomendó la continuación de la aplicación de este inmunógeno cubano a los principales grupos de riesgo.

**Palabras clave:** Leptospirosis, vax-SPIRAL, anticuerpos IgG, vacuna.

El principal mecanismo inmune estimulado por la mayor parte de las vacunas, radica en la capacidad lítica, opsonizante, neutralizante o bloqueadora mediada por anticuerpos, por lo que es necesario su detección.<sup>1</sup>

Los ensayos *in vitro* han sido utilizados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas o determinar el grado de protección en aquellos casos en los que se puedan establecer correlatos de protección con las pruebas *in vivo*.<sup>1,2</sup>

Dentro de las técnicas *in vitro* más utilizadas se encuentran los ensayos inmunoenzimáticos, por ser muy sensibles y específicos, de elevada precisión y exactitud, y además facilitan el estudio de un gran número de muestras.<sup>1,3-5</sup>

En los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) es muy importante el paso de sensibilización de esta fase, porque hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas en la primera capa sobre la matriz sólida y las que reaccionan en la segunda capa; esta proporcionalidad continúa en las posteriores capas y es responsable de la sensibilidad del ensayo.<sup>6,7</sup>

Teniendo en consideración que la inmunidad humoral desempeña un importante papel en la protección contra la leptospirosis, un sistema ELISA fue normalizado y validado en el Instituto Finlay (Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros, Cuba) para cuantificar la

<sup>1</sup> Máster en Ciencias. Licenciado en Microbiología. Investigador Agregado.

<sup>2</sup> Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Epidemiología.

<sup>3</sup> Técnico en Microbiología.

<sup>4</sup> Máster en Ciencias. Doctora en Medicina Veterinaria. Investigadora Auxiliar.

<sup>5</sup> Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

respuesta inmune humoral de IgG inducida en humanos por la vacuna cubana vax-SPIRAL, el cual usa como antígeno de recubrimiento de la fase sólida el antígeno vacunal, o sea, células inactivadas de los 3 serovares leptospirales (canicola, copenhageni y mozdok) de forma independiente.<sup>8</sup>

Ese sistema ELISA fue utilizado en este estudio con el objetivo de conocer la respuesta de anticuerpos IgG en individuos inmunizados con la vacuna vax-SPIRAL, y así profundizar en los conocimientos relacionados con el empleo de este inmunógeno cubano.

## MÉTODOS

### MUESTRAS

Fueron estudiados 930 voluntarios, de ellos 483 habían sido inmunizados con la vacuna cubana contra la leptospirosis humana (vax-SPIRAL) y 447 con una vacuna cubana contra la hepatitis B (grupo control). A cada uno se le había realizado la extracción de sangre para la obtención posterior de suero en el momento antes de aplicar la primera dosis de las vacunas (T0), 21 d después de la segunda dosis (T1) y al cabo de 1 año de haber realizado el esquema de inmunización (T2).

### PROCEDIMIENTOS

El estudio serológico se realizó a ciegas, una vez culminado el trabajo se descodificaron las muestras y se procedió al análisis estadístico de los resultados.

Los niveles de anticuerpos IgG en suero contra los serovares canicola, copenhageni y mozdok fueron determinados utilizando un sistema ELISA cuantitativo, previamente validado en el laboratorio (resultados no publicados).

Se utilizó un suero estándar común para los 3 serovares, confeccionado a partir de una mezcla de sueros de individuos vacunados con vax-SPIRAL, que contenía 31, 12 y 58 U IgG/mL contra los serovares canicola, copenhageni y mozdok, respectivamente.

El procedimiento seguido para el ELISA se describe a continuación. Las placas ELISA de poliestireno (Costar) fueron sensibilizadas con 100  $\mu$ L por pocillo de células de *Leptospira*

*interrogans* serovares canicola, copenhageni y mozdok por separado, previamente inactivadas con formaldehído; luego de una incubación durante toda la noche a 40 °C para su total desecación fueron lavadas 4 veces con solución salina tamponada de fosfatos (PBS) y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T) usando un lavador automático. Posteriormente se realizó el bloqueo con 150  $\mu$ L por pocillo de 3 % (p/v) de leche descremada en PBS y se incubó durante 1 h a temperatura de laboratorio (20-25 °C). La solución se eliminó mediante sacudidas suaves de la placa sobre papel absorbente y se añadieron el suero estándar, el control y las muestras.

La curva de calibración se preparó con 6 diluciones dobles y seriadas del suero estándar en PBS-T con 3 % (p/v) de leche descremada (PBS-TL) partiendo de una dilución 1:100. Los sueros a examinar fueron diluidos 1:200 en la misma solución anterior. Cuando la actividad de anticuerpos obtenida fue mayor que el primer punto de la curva de calibración para cada serovar, la muestra se repitió en una dilución mayor (1:400, 1:800, etc.) hasta obtener un valor que se corresponda con la curva. El suero control fue trabajado a una dilución 1:400. Se añadieron 100  $\mu$ L de cada dilución de la curva de calibración, el suero control y las muestras de suero a examinar por duplicado y se incubaron las placas a  $36 \pm 1$  °C en cámara húmeda durante 1 h. Después de realizar otro proceso de lavado como se indicó antes se añadieron 100  $\mu$ L por pocillo de anti-IgG humana marcada con peroxidasa de rábano picante (SIGMA A8419, USA) diluida 1:15 000 en PBS-TL y se incubaron nuevamente las placas a  $36 \pm 1$  °C en cámara húmeda durante 1 h. Después de lavar se añadió en cada pocillo 100  $\mu$ L de la mezcla reveladora (OPD, tampón citrato pH 5 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 %) y se incubaron las placas a temperatura de laboratorio en la oscuridad durante 20 min. Posteriormente se realizó una prelectura de densidad óptica (DO) en un lector de placas ELISA a 450 nm y si los valores del punto más alto de la curva estaban entre 0,5 y 0,6 se procedió a detener la reacción con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y se realizó la lectura final a 492 nm.

Los valores de absorbancia se transformaron en U IgG/mL con un programa computarizado desarrollado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, USA,

**TABLA.** Frecuencias porcentuales del aumento de la concentración de anticuerpos anti-leptospirales IgG en 2 veces o más respecto a T0 en cada grupo de estudio a cada serovar

Serovar	T 1			T 2		
	vax-SPIRAL (%)	Hepatitis B (%)	$\chi^2$ (p=0,000000)	vax-SPIRAL (%)	Hepatitis B (%)	$\chi^2$ (p=0,000000)
canicola	37,4	1,5	185	17,3	4,9	35,7
copenhageni	31,0	2,9	127	16,7	4,6	34,6
mozdok	30,6	3,1	122	12,6	3,8	23,5

T0: momento antes de aplicar primera dosis de las vacunas, T1: 21 d después de la segunda dosis de las vacunas, T2: 1 año de haber sido aplicado el esquema de inmunización.

que utiliza la función logistic-log de 4 parámetros para construir la curva de calibración. La determinación cuantitativa de anticuerpos anti-leptospira se realizó con el paquete de programas ELISA.<sup>9</sup>

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el cálculo de los valores promedios de concentración de anticuerpos anti-leptospira (U IgG/mL) para cada grupo en cada momento del estudio, así como sus intervalos de confianza. Se compararon los resultados de cada grupo por el método de  $\chi^2$ .

#### RESULTADOS

En la figura se presentan los niveles de anticuerpos IgG, cuantificados por el sistema ELISA, en respuesta a cada uno de los serovares constituyentes del preparado vacunal vax-SPIRAL en los voluntarios estudiados, usando como control una vacuna contra la hepatitis B.

Como se puede observar en el momento inicial del estudio (T0) había una alta prevalencia de anticuerpos a estos serovares leptospirales.

En la tabla se reflejan las frecuencias porcentuales del aumento de la concentración de anticuerpos anti-leptospirales IgG, en 2 veces o más respecto al tiempo inicial (T0) del estudio para cada grupo frente a cada serovar vacunal. Hubo un número importante de individuos en los que fue necesario realizar diluciones elevadas de los sueros, para lograr cuantificar el nivel de anticuerpos IgG mediante la curva de calibración.

Se pudo apreciar que al cabo del año la respuesta de anticuerpos IgG disminuye, sin

embargo, hay individuos que duplican su nivel de anticuerpos en relación con el momento inicial.

Otro resultado importante fue que se encontró que 45 % (217/483) de los voluntarios inmunizados con vax-SPIRAL duplicaron sus niveles de anticuerpos al menos a un serovar de la vacuna, al cabo de los 21 d después de la segunda dosis, mientras que en el grupo control se encontró 4,9 % (22/447), para un valor del estadígrafo  $\chi^2=194$  (p= 0,000000). Al cabo del año se encontró esta misma respuesta en 23,1 % (112/483) y 6,9 % (31/447) de los individuos que recibieron vax-SPIRAL y la vacuna contra la hepatitis B respectivamente, para una  $\chi^2= 47,13$  (p= 0,000000).

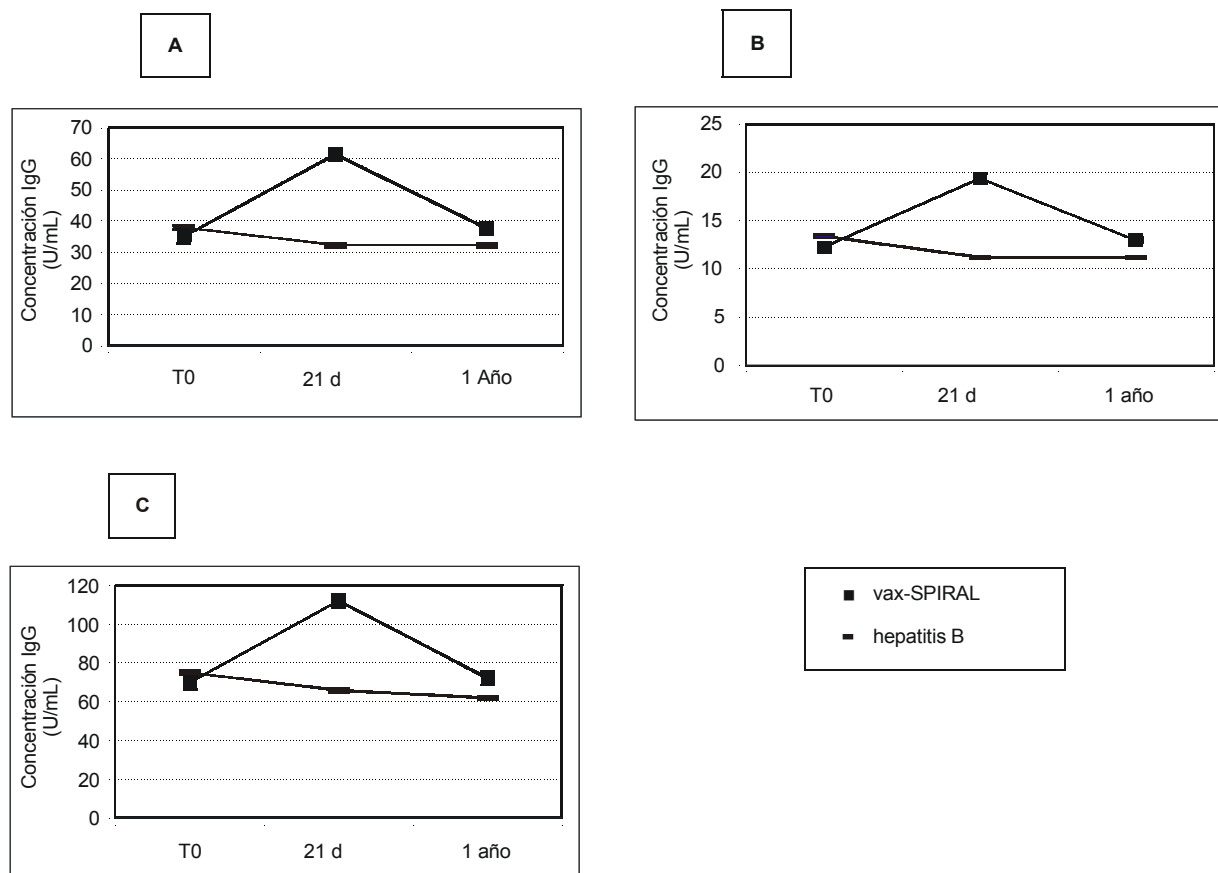
Se encontraron diferencias muy significativas (p= 0,000000) entre las respuestas detectadas en el grupo de estudio y el grupo control en los diferentes momentos ensayados para cada serovar de la vacuna.

#### DISCUSIÓN

Ha sido demostrado que uno de los mecanismos que participa en la inmunidad a la leptospirosis es la producción de anticuerpos aglutinantes y opsonizantes, dirigido fundamentalmente contra los antígenos de la membrana externa como los lipopolisacáridos (LPS) y las proteínas.<sup>10-13</sup>

La determinación de la respuesta de anticuerpos IgG inducida por una vacuna contra la leptospirosis es de gran importancia, pues desempeñan un importante papel en la protección contra esta entidad dada su capacidad opsonizante.<sup>14</sup>

Vax-SPIRAL es una bacterina trivalente de células completas que actúa como un complejo



**Fig.** Respuesta de anticuerpos IgG antileptospira en los grupos estudiados frente a los 3 antígenos vacunales durante el año de estudio. A: serovar canicola, B: serovar copenhageni, C: serovar mozdok.

multiantigénico, donde hay un favorecimiento de las estructuras superficiales proteicas de la membrana externa.<sup>2,14</sup> Actualmente se conoce que existen además de los LPS, otras biomoléculas de naturaleza proteica y componentes de la membrana externa, que tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en animales, demostrado mediante ensayos de reto, tanto con cepas homólogas como heterólogas.<sup>15,16</sup>

Como no se conoce hacia qué antígenos está dirigida la respuesta inmune humoral en personas vacunadas, se decide utilizar un sistema ELISA que emplee como antígeno de recubrimiento los antígenos vacunales, y de esta forma cuantificar los niveles de anticuerpos IgG dirigidos contra todos los componentes potencialmente inmunogénicos, aunque no es recomendable la utilización de un antígeno celular para diferenciar la respuesta a cada uno de los serovares, porque se pueden encontrar anticuerpos contra componentes proteicos que

muestran reactividad cruzada entre los serogrupos.<sup>14-16</sup>

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten plantear que el inmunógeno cubano es capaz de inducir anticuerpos contra sus 3 serovares componentes de forma similar, lo que demuestra una vez más su capacidad de inducir una respuesta de tipo múltiple.

Un hallazgo interesante es la alta prevalencia de anticuerpos encontrados a estos serovares en el momento de comienzo del estudio, lo que demuestra el nivel de exposición de los voluntarios a esta enfermedad endémica en el medio cubano y confirma que, estos serovares forman parte de los serogrupos aislados con mayor frecuencia.<sup>17,18</sup>

Esta alta seroprevalencia de anticuerpos puede ser la causa de que en muchos voluntarios no se haya logrado un incremento de anticuerpos hasta niveles que dupliquen el valor inicial, lo que no significa necesariamente que no estén protegidos,

pues ya se ha reportado que el nivel de IgG específica medido en el suero de personas expuestas al riesgo natural está relacionado con la protección.<sup>2</sup> En un estudio similar con este inmunógeno en poblaciones de riesgo se plantea que el nivel de respuesta a la vacuna está influenciado por el nivel de exposición del individuo, encontrando respuestas para cada serovar entre 63,77 y 70,04 % de los individuos vacunados.<sup>14</sup>

En un estudio inicial de la inmunogenicidad de este preparado vacunal, mediante un ELISA que empleaba como recubrimiento de la fase sólida un antígeno proteico género-específico, se encontró que 34,2 % de los voluntarios que recibieron la vacuna seroconvertían a los 21 d después de aplicada la segunda dosis, mientras que en el grupo que recibió el placebo lo hacía 6 %;<sup>19,20</sup> y a través de la microaglutinación de serogrupos con antígenos vivos se vio que la respuesta principal era a los serovares copenhageni y mozdok en los vacunados con vax-SPIRAL;<sup>19</sup> sin embargo, en el presente estudio se ha podido detectar mediante este sistema ELISA respuesta de anticuerpos a los 3 serovares vacunales.

Los diferentes estudios relacionados con bacterinas contra la leptospirosis humana, han dado como resultado que producen una protección corta, de 6 meses a 1 año, y que por lo general inducen bajos niveles de anticuerpos aglutinantes, lo cual puede no estar correlacionado con los niveles de protección conferidos,<sup>21,22</sup> por ello sería interesante realizar otro estudio con intervalos de tiempo inferiores a 1 año para conocer en qué momento los niveles de anticuerpos IgG comienzan a declinar.

Este trabajo ha permitido conocer la respuesta de anticuerpos específicos IgG antileptospira en individuos inmunizados con vax-SPIRAL, primera bacterina cubana contra esta entidad, durante un período de 1 año, y recomienda la continuación de su aplicación a los grupos de riesgo.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado y asesorado en parte por el Instituto Finlay (Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros, Cuba). El colectivo de autores agradece la ayuda brindada por el doctor Rolando Ochoa y la licenciada Xenia Ferriol.

#### Response of antileptospira IgG antibodies in individuals immunized with vax-SPIRAL

##### SUMMARY

A quantitative ELISA for the detection of IgG antibodies in response to the Cuban vaccine against the human leptospirosis (vax-SPIRAL) was applied to 930 volunteers' sera, 483 immunized with vax-SPIRAL and 447 with a vaccine against hepatitis B. Samples were taken before beginning the study, 21 days after the second dose and a year later. A high seroprevalence of antibodies to the vaccine serovars was observed before beginning the study. The initial value of the response doubled at 21 days of the second dose in 45 % of the individuals. There were markedly significant differences ( $p=0,000000$ ) between both groups. A similar response to the three leptospiral serovars was found. After the year the levels of antibodies decreased; however, 23.1 % of the individuals were able to duplicate their level of antibodies regarding the initial moment, and the significant difference with the group that received the vaccine against hepatitis B still existed. The application of this Cuban immunogen among the main risk groups was recommended.

**Key words:** Leptospirosis, vax-SPIRAL, IgG antibodies, vaccine.

##### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor* 2000;9(3):13-8.
- 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;10(3):1-6.
- Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, et al. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor* 2000;9(1):1-4.
- Korver H. ELISA for the detection of anti-*Leptospira* IgM and IgG antibodies in serum from vaccinated persons. *Pharmeuropa* 1999;99(2):111-6.
- Varney C. The development of a monoclonal antibody based ELISA for measuring antibodies to canine leptospira vaccines. *Pharmeuropa* 1999;99(2):81-94.
- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, et al. Sensibilización de placas para ensayos inmunoenzimáticos con antígenos vacunales. *VacciMonitor* 2001;10(4):14-7.
- Tijssen P. The immobilization of immunoreactants on solid phases. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, eds. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays*. Amsterdam: Elsevier; 1993. p. 297-328.
- Ferriol X, Ochoa R, Rodríguez Y, García AM, González M, Martínez JC, et al. Normalización y validación de ensayos inmunoenzimáticos para cuantificar IgG humana antileptospira serovares *Canicola canicola*, *Icterohaemorrhagiae copenhageni* y *Pomona mozdok*. *VacciMonitor* 2001;10(3):13-9.
- Plikaytis BD, Carlone GM, Turner SH, Gheesling LL, Holder PF. *Program ELISA user's manual*. Atlanta: Centers for Diseases Control and Prevention; 1993.

10. Jost BH, Adler B, Vinh T, Faine S. Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. J Med Microbiol 1989;29:115-20.
11. Chapman AJ, Faine S, Adler B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalent hardjo/pomona leptospiral vaccine. FEEMS Microbiol Immunol 1990;64:111-8.
12. Chapman AJ, Everard COR, Faine S, Adler B. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. Epidemiol Infect 1991;107:143-55.
13. Gitton X, Daubie MB, André F, Ganière JP, André-Fontaine G. Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs. Vet Microbiol 1994;41:87-97.
14. Rodríguez Y, González M, Ferriol X, Medina R, Ochoa R, Baró M, et al. Respuesta IgG inducida en población de riesgo vacunada con vax-SPIRAL (Vacuna Antileptospirosis Trivalente: canicola, copenhageni y mozdok). VaccinMonitor 2001;10(3):7-12.
15. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine 2000;19(1):86-94.
16. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski 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):6831-38.
17. Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C, Obregón AM, Victoria B. Leptospirosis Humana en Cuba: Un acercamiento al conocimiento de sus principales reservorios. Bol Epid Sem IPK 2002;12(1):2-4.
18. Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol 2002;40(1):11-5.
19. Martínez R, Obregón AM, Pérez A, Baly A, Díaz M, Baró M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Trop 1998;50(2):159-66.
20. Obregón AM, Martínez G, Martínez R, Llop A, Rodríguez I, Rodríguez J et al. Respuesta serológica por ELISA y MAT en voluntarios cubanos vacunados con vaxSPIRAL. Rev Cubana Med Trop 2004;56(2):148-51.
21. Iagovkin EA. The improvement of immunobiological preparations against leptospirosis. Microbiol Epidemiol Immunobiol 1990;2:47-51.
22. 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.

Recibido: 27 de diciembre de 2004. Aprobado: 10 de marzo de 2005.

Lic. *Islay Rodríguez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2 , Apartado postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: islay@ipk.sld.cu