

Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes contra *Leptospira interrogans*

Andrés González, Niurka Batista, Manuel Ortíz, Vismark Torres, Juan F. Infante y Marta González

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

E-mail: andresglez@finlay.edu.cu

Los antisueros policlonales utilizados para el serotipaje de cepas de *Leptospira* deben caracterizarse por un alto nivel de aglutininas específicas a un serogrupo o serovar determinado y una baja reactividad cruzada frente al resto de las serovariedades. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar y comparar dos de los esquemas de inmunización reportados para la obtención de sueros hiperinmunes específicos a *Leptospira* en conejos. Los esquemas recomendados fueron comparados por el Subcomité Taxonómico Internacional de *Leptospira* (TSCL) y por el Ministerio de la Agricultura de Cuba (MINAGRI), empleando como antígenos cepas de referencia correspondientes a los serogrupos *Australis* y *Tarassovi*. Se evaluaron las dinámicas de aglutininas desarrolladas frente a cada antígeno mediante cada esquema utilizando la técnica de aglutinación microscópica. Se evaluó asimismo la especificidad de los antisueros obtenidos frente a 11 serogrupos de *Leptospira interrogans*. Los títulos de aglutininas obtenidos mediante el esquema recomendado por el TSCL fueron superiores a los obtenidos mediante el esquema recomendado por el MINAGRI. Los antisueros producidos mediante ambos esquemas de inmunización fueron altamente específicos para sus respectivos serogrupos homólogos con ausencia de reactividad cruzada detectable por microaglutinación frente a todos los serogrupos heterólogos evaluados.

Palabras claves: *Leptospira*, antisueros policlonales

Introducción

Aunque en los últimos años han sido introducidos una gran variedad de modernos métodos para el análisis genético, tipaje y clasificación de cepas de *Leptospira*, estos no están al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos de los países en desarrollo debido a su alto costo (1-3). La clasificación serológica mediante la técnica de microaglutinación con el empleo de antisueros policlonales de conejo sigue siendo el método más utilizado a pesar de ser laborioso y limitado para la clasificación hasta serovar, si no se dispone de una batería de anticuerpos monoclonales (3-5). El empleo de técnicas serológicas de clasificación han permitido el reconocimiento de al menos 11 serogrupos de circulación en humanos en Cuba de los 23 serogrupos de *Leptospira interrogans* existentes en la actualidad (6).

Los antisueros policlonales de referencia se caracterizan por un alto nivel de aglutininas específicas a un serogrupo o serovar determinado y una baja reactividad cruzada frente al resto de las serovariedades. Estos son producidos en laboratorios especializados y su costo en el mercado internacional

es elevado (5, 7). La disponibilidad de una batería de antisueros policlonales anti-*Leptospira* reviste vital importancia para lograr una vigilancia epidemiológica eficaz en el país y encaminar presentes y futuros programas de vacunación. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de comparar la calidad de los antisueros policlonales obtenidos mediante la aplicación de dos de los esquemas de inmunización reportados por organismos nacionales e internacionales para la obtención de sueros hiperinmunes específicos a *Leptospira* en conejos.

Materiales y Métodos

Antígenos

Se emplearon como antígenos dos cepas de referencia correspondientes a los serogrupos *Australis* (cepa Ballico) y *Tarassovi* (cepa Perepelicin) donadas por el Laboratorio de Referencia Internacional de *Leptospira* del Instituto de Medicina Tropical de Holanda. Ambas cepas conservadas en medio semisólido de Fletcher (8) fueron crecidas en medio líquido EMJH (9, 10) a 30 °C bajo condiciones estáticas, tras lo cual se procedió a la siembra por diseminación en placas de medio EMJH

sólido (1% agar noble, 0,1% actidione) para garantizar el trabajo con clones antigénicos puros.

La identidad de las cepas clonadas fue corroborada mediante la técnica de aglutinación microscópica (MAT) (11) empleando antisueros policlonales de referencia homólogos.

Animales

En la evaluación se utilizaron conejos Nueva Zelanda jóvenes y saludables de 3 kg de peso, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), los cuales fueron testados para la detección de anticuerpos específicos a *Leptospira* previo a la primera dosis de antígeno.

Inmunización

Se aplicaron dos esquemas de inmunización para cada uno de los dos antígenos utilizados en el estudio empleando tres animales para cada variante esquema/antígeno. Un primer esquema de seis semanas, recomendado por el Subcomité Taxonómico de *Leptospira* (TSCL) de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (5,7) consistió en la aplicación por vía endovenosa de cinco dosis sucesivas separadas a intervalos de una semana con volúmenes de 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL y 6 mL de antígeno vivo procedente de un cultivo en medio EMJH en fase exponencial (6-7 días) con una concentración de 2×10^8 leptospiras/mL crecido bajo condiciones de temperatura y agitación controladas (30 °C, 130 rpm).

El segundo esquema de solo tres semanas recomendado por la Norma Ramal 673 del Ministerio de la Agricultura de Cuba (12) consistió en la aplicación por vía endovenosa de dos dosis sucesivas de 4 mL separadas a intervalo de una semana, empleando en la primera dosis antígeno inactivado por calor a 56 °C durante 30 min, y en la segunda antígeno vivo, ambas procedentes de un cultivo en medio EMJH en fase de crecimiento exponencial que contenían 2×10^8 leptospiras/mL y que crecieron bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación.

En ambos casos los animales fueron sangrados por punción intracardiaca a los 14 días de la última dosis y el suero fue colectado convenientemente, filtrado y conservado a -20 °C.

Determinación de la dinámica de aglutininas

Se determinó por MAT la dinámica de aglutininas desarrollada en los animales mediante la aplicación de cada esquema de inmunización. Para estas determinaciones se tomaron muestras de suero individuales semanalmente durante el transcurso de la inmunización hasta el sangrado final.

Evaluación de la especificidad

La especificidad de los antisueros obtenidos mediante cada esquema fue evaluada por MAT frente a una batería de cepas de referencia correspondiente a los serogrupos de *Leptospira* de circulación en humanos en Cuba (Tabla 1).

Tabla 1. Batería de cepas de referencia de *Leptospira* empleada en la evaluación de la especificidad

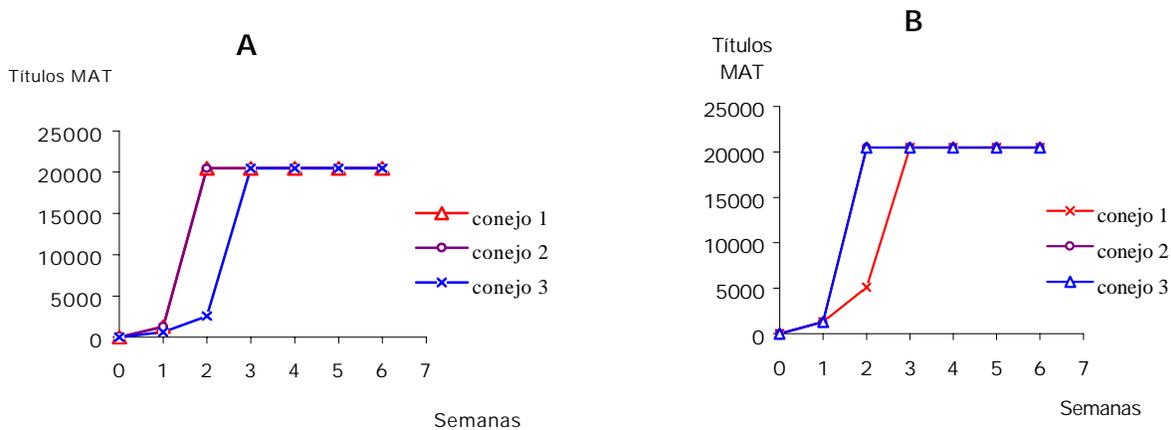
Cepa	Serogrupo	Serovar
Mus 127	<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>
5621	<i>Pomona</i>	<i>mozdok</i>
Hond Utrecht	<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>
M 20	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>
Salinem	<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>
Perepelicin	<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>
Ballico	<i>Australis</i>	<i>australis</i>
Worsfold	<i>Hebdomadis</i>	<i>worsfold</i>
Van Tienen	<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>
Akiyami A	<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
Hardjoprajitno	<i>Sejroe</i>	<i>hardjo</i>

Resultados y Discusión

Al evaluar la dinámica de anticuerpos aglutinantes desarrollada por cada antígeno mediante el esquema de inmunización recomendado por el TSCL se apreció un comportamiento homogéneo en todos los animales independientemente del antígeno empleado,

alcanzando en todos los casos títulos MAT superiores a 1: 20 000. Este elevado título se alcanzó después de la segunda o tercera dosis (14-21 días) y se mantuvo inalterable hasta el sangrado de los animales a la sexta semana de iniciado el esquema (Figura 1).

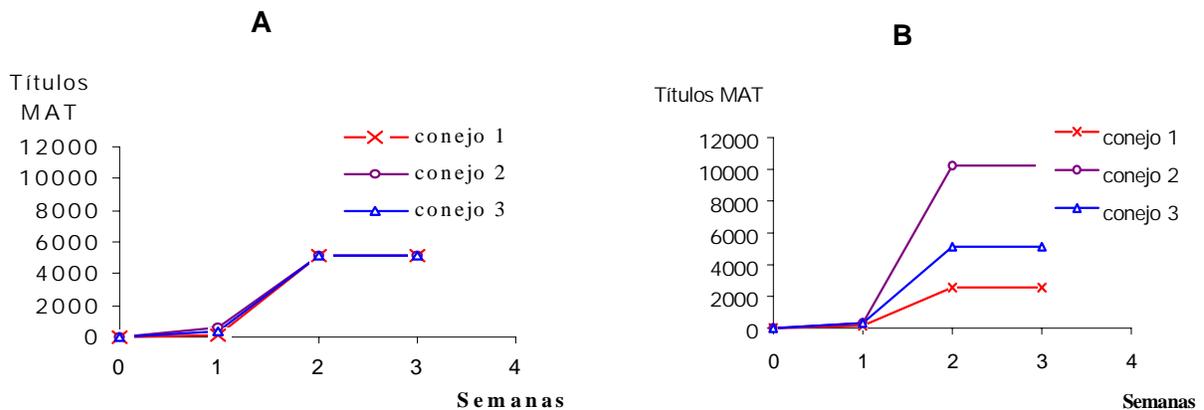
Figura 1. Dinámica de anticuerpos aglutinantes obtenida mediante el esquema recomendado por el Subcomité Taxonómico de *Leptospira* utilizando como antígeno *L. Australis* (A) y *L. Tarassovi* (B).



Por su parte, la respuesta de anticuerpos aglutinantes obtenida mediante el esquema recomendado por el MINAGRI no fue homogénea en todos los animales

inmunizados, alcanzando un título promedio final de 1: 5 120 para ambos antígenos tras finalizar el esquema (Figura 2).

Figura 2. Dinámica de anticuerpos aglutinantes obtenida mediante el esquema recomendado por el MINAGRI utilizando como antígeno *L. Australis* (A) y *L. Tarassovi* (B)



Numerosos investigadores reportan la disminución apreciable de la antigenicidad e inmunogenicidad de

antígenos de *Leptospira* inactivados por métodos físicos (calor) o químicos (formalina, fenol, etc.)

(13-17). La inactivación física o química del microorganismo trae como consecuencia la destrucción o alteración irreversible de epítopes de superficie implicados en la respuesta humoral, lo cual conlleva a una disminución de la misma o a la producción de anticuerpos que no reconocen los antígenos en su conformación nativa. Esto explica la inferioridad de los títulos de aglutininas obtenidos mediante la aplicación del esquema de inmunización recomendado por el MINAGRI. Aún cuando el número de dosis aplicadas constituye una variable que influye en la magnitud de la respuesta, este factor resultó de menor importancia al comparar ambos esquemas si tenemos en cuenta los altos títulos de aglutininas obtenidos tras la aplicación de las dos primeras dosis de antígeno vivo del esquema propuesto por el TSCL. Capacidades inmunológicas individuales diferentes pudieran ser la causa principal de la variabilidad en la magnitud de la respuesta humoral obtenida con el esquema recomendado por el MINAGRI utilizando como antígeno *L. Tarassovi*. Esta heterogeneidad de los resultados pudiera resolverse con la aplicación de un mayor número de dosis de antígeno.

Al evaluar la especificidad de cada inmunosuero frente a una batería de cepas de referencia constituida por los serogrupos de circulación en humanos en Cuba no se apreció reactividad cruzada detectable por MAT en ningún caso. Resultados similares de especificidad fueron obtenidos con la aplicación de ambos esquemas de inmunización. Las respuestas de aglutinación tienen su base molecular en el reconocimiento y unión específica de las aglutininas (IgM, IgG) del suero a una gran diversidad de epítopes de superficie serogrupo o serovar específicos, expresados en la membrana externa del microorganismo. Algunos serovares e incluso serogrupos de *Leptospira* pueden compartir entre sí antígenos o epítopes de superficie (18-20). Estas similitudes antigénicas entre diferentes cepas conllevan a la inducción de anticuerpos específicos a más de un serovar o serogrupo, lo cual determina el establecimiento de reacciones cruzadas independientemente del esquema de inmunización empleado en la producción del antisuero. De esta forma un antisuero podrá aglutinar no solo a su cepa homóloga, sino también a una cepa heteróloga antigénicamente relacionada, aunque generalmente esta reacción cruzada ocurre con menor fuerza (título menor) y se debe a la fracción de aglutininas dirigida contra los epítopes compartidos. Resultados similares ocurren con algunos anticuerpos monoclonales frente a serovares de un mismo serogrupo (4). La ausencia de reactividad cruzada en los antisueros producidos contra

las cepas de referencia pertenecientes a los serogrupos *Australis* y *Tarassovi* indica una ausencia o pequeña similitud antigénica de estas cepas con el resto de las cepas pertenecientes a los diferentes serogrupos utilizados en la evaluación, lo cual avala una alta especificidad de los antisueros producidos.

Los resultados de este estudio sugieren una mayor calidad de los antisueros policlonales obtenidos mediante el esquema recomendado por el TSCL, en comparación con los obtenidos aplicando el esquema recomendado por el MINAGRI, dado por una apreciable superioridad de los títulos de aglutininas específicas y una mayor homogeneidad de los resultados.

Referencias

1. Hermann J.L., Bellenger E., Perolat P., Baranton G. and Saint Girons I. Pulsed-field gel electrophoresis of notI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:1696-1702.
2. Hermann J.L. Genomic techniques for identification of *Leptospira* strains. *Path. Biol.* 1993; 41:943-950.
3. Levett P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14 (2): 296-326.
4. Terpstra W.J., Hartskeerl, R.A., Smits, H.L., Korver, H. *International course in laboratory techniques for the diagnosis of Leptospirosis*. Amsterdam: Royal Tropical Institute; 2000.
5. Faine, S., B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat. *Leptospira and Leptospirosis*, 2nd ed. Melbourne: MedSci; 1999.
6. Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C, Obregón A, Victoria B. Leptospirosis humana en Cuba. Un acercamiento al reconocimiento de sus principales reservorios. *Boletín epidemiológico semanal del IPK*. 2002; 12 (1).
7. Faine S. *Guidelines for the control of Leptospirosis*. Geneva: W.H.O; 1982.
8. Fletcher W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1928; 21: 265-282.
9. Ellinghausen, H. C., and W. G. McCullough. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 1965; 26:45-51.
10. Johnson, R. C., and V. G. Harris. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. 1. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 1967; 94:27-31.
11. Cole, J. R., C. R. Sulzer, and A. R. Pursell. 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Microbiol.* 25:976-980.

12. Cuba, Ministerio de la Agricultura. *Norma Ramal 673. Diagnóstico Veterinario de Leptospirosis*. La Habana: MINAGRI; 1982.
13. Babudieri B., Castelli M., Pisoni F. Comparative test with formalized and irradiated vaccines against leptospirosis. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 1973; 48:587-590.
14. Painter G.M., Ellinghausen H.C. Immunising potency of *Leptospira interrogans* serotype *canicola* after heat inactivation at different temperatures. *J. Med. Microbiol.* 1976; 9:487-492.
15. Palmer M.F., Waitkins S.A., Wanyangu S.W. A comparison of live and formalised leptospiral microscopic agglutination test. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 265. 1987:151-159.
16. Adler B., Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J. Hyg., Camb.* 1980; 84: 1-10.
17. Masuzawa T., Nakamura R., Shimizu T., Yanagihara Y. Heat stability of protective antigen of *Leptospira interrogans* serovar *lai*. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28 (4):660-663.
18. Chapman A.J., Everard C.O.R., Faine S., Adler B. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. *Epidemiol. Infect.* 1991; 107:143-155.
19. Cinco M. Delneri D., Banfi E. Immunodominant antigens recognized by the human immune response to infection by organisms of the species *Leptospira interrogans* serogroup *Australis*. *FEMS Microbiol Immunol.* 1992; 89:287-298.
20. Kashiwase H., Ono E., Yanagawa R., Shimizu Y., Kida H. A neutral sugar is responsible for serovar specificity of the antigenic determinant of *Leptospira interrogans* serovar *canicola*. *Jpn. J. Vet. Res.* 1994; 42:103-108.

Evaluation of two immunization schedules for production of hyperimmune sera against *Leptospira interrogans*

Abstract

Polyclonal antisera used for serotyping *Leptospira* strains must contain a high level of specific agglutinins against a serogroup or serovar and a low cross-reactivity against other serovarieties. The purpose of this study was to evaluate and compare two immunization schedules reported for obtaining *Leptospira* specific hyperimmune sera in rabbits. The schedules recommended by the International Taxonomic Subcommittee on *Leptospira* (TSCL) and the Cuban Ministry of Agriculture (MINAGRI) were compared using reference strains of the serogroups *Australis* and *Tarassovi* as antigens. Agglutinin dynamics were evaluated by the microscopic agglutination test and cross-reactivity of antisera was determined using 11 different serogroups. Agglutinin titers obtained with the schedule recommended by TSCL were higher than those obtained with the schedule recommended by MINAGRI. Antisera produced by both schedules were highly specific and no cross-reactivity was detected.

Keywords: *Leptospira*, polyclonal antisera.