

Efecto *booster* de una inmunización activa con *Leptospira interrogans* serogrupo *Ballum* en hámsters vacunados con vax-SPIRAL[®]

Andrés González, Yoandra Rodríguez, Niurka Batista, Yolanda Valdés, Juan F. Núñez y Marta González

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.
Email: andresglez@finlay.edu.cu

Se evaluó en hámsters la inmunidad cruzada y capacidad protectora conferidas por la vacuna antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL[®] frente a *Leptospira interrogans* serogrupo *Ballum*, así como el efecto de una inmunización activa con preparación vacunal monovalente de *Ballum* en animales previamente inmunizados con la vacuna trivalente. La respuesta IgG específica a *Ballum*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona* inducida tras cada inmunización se determinó mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras. La capacidad de protección heteróloga de vax-SPIRAL[®] se evaluó frente al reto con 100 y 10 000 DL₅₀ de dos cepas clínicas de *Ballum* altamente virulentas. Tras 14 días de culminado el esquema de inmunización la vacuna trivalente indujo un 100% de seroconversión de IgG específica a *Ballum* en los animales inmunizados y una total protección cruzada frente a la infección letal y la prevalencia de leptospirosis en hígado y riñón. La aplicación de una única dosis de preparación monovalente de *Ballum* tras 6 semanas de culminado el esquema de inmunización de vax-SPIRAL[®] reforzó la inmunidad frente a los cuatro serogrupos de *Leptospira* de mayor circulación en humanos en Cuba.

Palabras claves: *Leptospira*, inmunidad cruzada, vax-SPIRAL[®], *Ballum*

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial, causada por una espiroqueta perteneciente a la especie fenotípica *Leptospira interrogans* (1). Pequeñas variaciones en las cadenas polisacáridicas del lipopolisacárido de *Leptospira* determinan la existencia de más de 200 serovariedades (serovares) patógenas agrupadas en 24 serogrupos (1, 2). Dada la inmunodominancia de esta macromolécula de superficie la inmunidad contra la infección leptospirósica es mayormente serogrupo/serovar específica (1), aunque estudios recientes sugieren la existencia de inmunidad cruzada entre serogrupos diferentes asociados a proteínas altamente conservadas (3, 4).

La vacuna antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL[®], diseñada para establecer protección frente a los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*, ha logrado controlar y disminuir la morbiletalidad de la leptospirosis humana en Cuba con una alta efectividad (5, 6). A pesar de la creciente incidencia del serogrupo *Ballum* en grupos de riesgo del país (7), los ensayos clínicos de vax-SPIRAL[®] reflejan una

elevada eficacia global frente a la infección por *Leptospira* (8). Estos resultados sugieren el establecimiento de un determinado nivel de protección cruzada en humanos frente a la infección con serovariedades no incluidas en la formulación, lo cual incluye a *Ballum*, el serogrupo más frecuentemente aislado de muestras clínicas en la actualidad (7). Esta supuesta inmunidad cruzada de vax-SPIRAL[®] frente a *Ballum* en personas vacunadas supondría un efecto *booster* o refuerzo de la inmunidad en estas personas al entrar en contacto con antígeno de *Ballum* de forma natural o como resultado de una inmunización activa.

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar en hámsters la capacidad inmunoprotectora de vax-SPIRAL[®] frente a *Ballum*, así como el efecto de una inmunización activa con preparación vacunal monovalente de *Ballum* en animales previamente inmunizados con la vacuna trivalente.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se utilizaron en el estudio las cepas vacunales 87, 169 y 108 de *Leptospira interrogans*, pertenecientes

a los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*, las cuales fueron originalmente aisladas a partir de material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana. Se emplearon, además, las cepas clínicas 12399 y 42600 pertenecientes al serogrupo *Ballum*, las cuales fueron aisladas por hemocultivo a pacientes con leptospirosis en la provincia de Holguín. Desde su aislamiento todas las cepas fueron conservadas en medio semisólido de Fletcher (9). La virulencia fue mantenida a través de pases periódicos en hámsters según los métodos descritos (10). La dosis letal media (DL₅₀) fue determinada mediante la metodología propuesta por Fajardo y colaboradores (11).

Preparaciones vacunales

Para la inmunización con vax-SPIRAL® se empleó el lote 0031 de esta vacuna comercial.

Composición por dosis (0,5 mL):

Células enteras inactivadas de

<i>L. Canicola</i>	5-8 × 10 ⁷
Células enteras inactivadas de <i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	5-8 × 10 ⁷
Células enteras inactivadas de <i>L. Pomona</i>	5-8 × 10 ⁷
Gel de hidróxido de aluminio	1 mg
Tiomersal.....	0,05 mg

Para la inmunización con el serogrupo *Ballum* se formuló una preparación vacunal monovalente a partir de la cepa 12399 siguiendo la metodología utilizada para la vacuna trivalente (12).

Composición por dosis (0,5 mL):

Células enteras inactivadas de <i>L. Ballum</i>	1,5-2,4 × 10 ⁸
Gel de hidróxido de aluminio.....	1 mg
Tiomersal.....	0,05 mg

Animales, inmunización y reto

Un grupo de 90 hámsters sirios (*Mesocricetus aureatus*) de 45-50 gramos de peso, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), fueron inmunizados con vax-SPIRAL® mediante dos dosis de 0,5 mL por vía intramuscular, separadas por un intervalo de 6 semanas (13).

Posterior a 14 días de culminado el esquema de inmunización 40 animales inmunizados fueron

retados heterológicamente con 100 y 10 000 DL₅₀ de cada cepa de *Ballum* utilizada en el estudio, mientras otro grupo de 30 animales se utilizó como control de potencia de vax-SPIRAL® y se retó con 10 000 DL₅₀ de cada cepa componente de la vacuna trivalente. En todos los casos el reto se realizó por vía intraperitoneal empleando 0,5 mL como volumen de inóculo y 10 animales por variante de reto.

El resto de los animales inmunizados con la vacuna trivalente fueron mantenidos bajo condiciones adecuadas hasta 6 semanas de aplicada la segunda dosis. Transcurrido este período de tiempo posvacunación 10 animales recibieron una dosis adicional de 0,5 mL por vía intramuscular de preparación vacunal monovalente de *Ballum*, mientras los restantes 10 animales fueron empleados como controles no reinmunizados. Un grupo adicional de 10 animales del mismo lote no recibió ninguna de las dos vacunas y se empleó como control no inmunizado.

Evaluaciones serológicas

Fueron tomadas muestras de sangre por vía retroorbital y de forma individual a todos los animales previo a la primera inmunización y en las semanas 2, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 14 y 15. Los sueros fueron colectados por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min, convenientemente rotulados y conservados a -20 °C hasta su evaluación.

Se evaluó mediante un sistema ELISA indirecto cuantitativo la respuesta de anticuerpos IgG específica a cada antígeno de *Leptospira*, empleado en la inmunización de *Ballum*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*. Se utilizó como antígeno de recubrimiento en cada caso las células completas inactivadas (formalina 0,5%, 20 min) y lavadas (Tampón Fosfato Salino, pH 7.2) de las cepas 12399, 87, 169 y 108, respectivamente. Las placas (COSTAR®, Estados Unidos) fueron sensibilizadas con 100 µL de antígeno ajustado a 2 × 10⁸ células/mL y desecadas toda la noche a 50 °C. Las células no adsorbidas se eliminaron mediante lavados con agua destilada y 0,05% (v/v) de Tween 20. El bloqueo se realizó con leche descremada al 3% (p/v) en Tampón Fosfato Salino (TFS). Las muestras de suero a evaluar se diluyeron 1:200 en TFS con 3% de leche descremada y 0,05% de Tween 20. Se utilizó como conjugado proteína A-peroxidasa (SIGMA, Estados Unidos) diluido

1:15 000 en el mismo medio de las muestras. El revelado se realizó adicionando la mezcla sustrato-cromógeno peróxido de hidrógeno 0,03%-OPD 1 mg/mL y buffer fosfato citrato pH 5. La reacción se detuvo a los 20 min de incubación a temperatura ambiente y las absorbancias se midieron utilizando un lector de ELISA (Titertek-Multiskan®, Finlandia) a una longitud de onda de 492 nm. Los valores de absorbancia se transformaron en U/mL según la curva de calibración obtenida con un suero estándar preparado previamente a partir de la mezcla de 10 sueros de hámsters con elevados títulos de aglutininas frente a los cuatro antígenos según aglutinación microscópica (14), a este suero se le asignaron 100 U/mL de forma arbitraria.

Evaluación de la protección

Tras 14 días de realizado el reto se registraron los niveles de sobrevivencia y mortalidad y se procedió a la eutanasia de todos los animales sobrevivientes. Se estudió la prevalencia de leptospiras en órganos diana de la infección mediante análisis anatomopatológico macroscópico y cultivos de hígado y riñón en medio EMJH. Los cultivos de órganos fueron incubados durante 60 días a 28 °C bajo condiciones estáticas.

Resultados

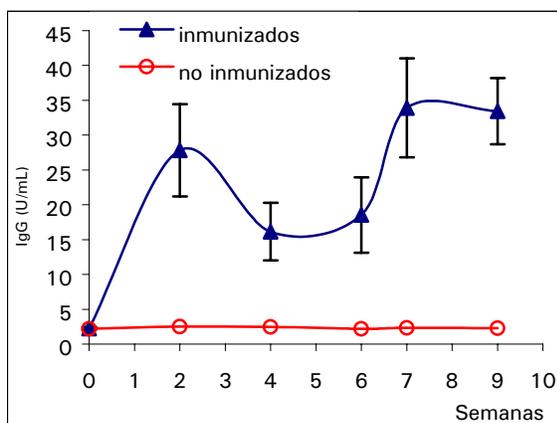
Al evaluar la respuesta IgG específica a *Ballum* inducida tras la inmunización con vax-SPIRAL® se apreció un 100% de seroconversión ($T/T_0 \geq 4$), incluso tras la primera dosis de vacuna trivalente (Tabla 1).

Tabla 1. Seroconversión de anticuerpos IgG específicos a *L. Ballum* inducidos en hámsters tras la inmunización con vax-SPIRAL®

Tiempo	Concentración de IgG (U/mL) por animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
To	2,467	2,589	1,466	1,916	2,494	2,535	2,104	1,876	1,539	2,003
T ₂	23,14	49,00	8,42	25,29	19,97	41,14	38,45	30,76	14,98	16,78
T ₇	38,37	38,17	58,47	11,34	33,59	23,57	41,78	35,67	50,03	47,63

Transcurridas 6 semanas de la primera dosis vacunal los niveles de IgG específica disminuyeron ligeramente para luego incrementarse tras la segunda dosis, sin sobrepasar por mucho el nivel máximo logrado luego de la primera inmunización (Figura 1).

Figura 1. Respuesta IgG específica a *L. Ballum* inducida tras dos dosis de vacuna trivalente vax-SPIRAL® en hámsters.



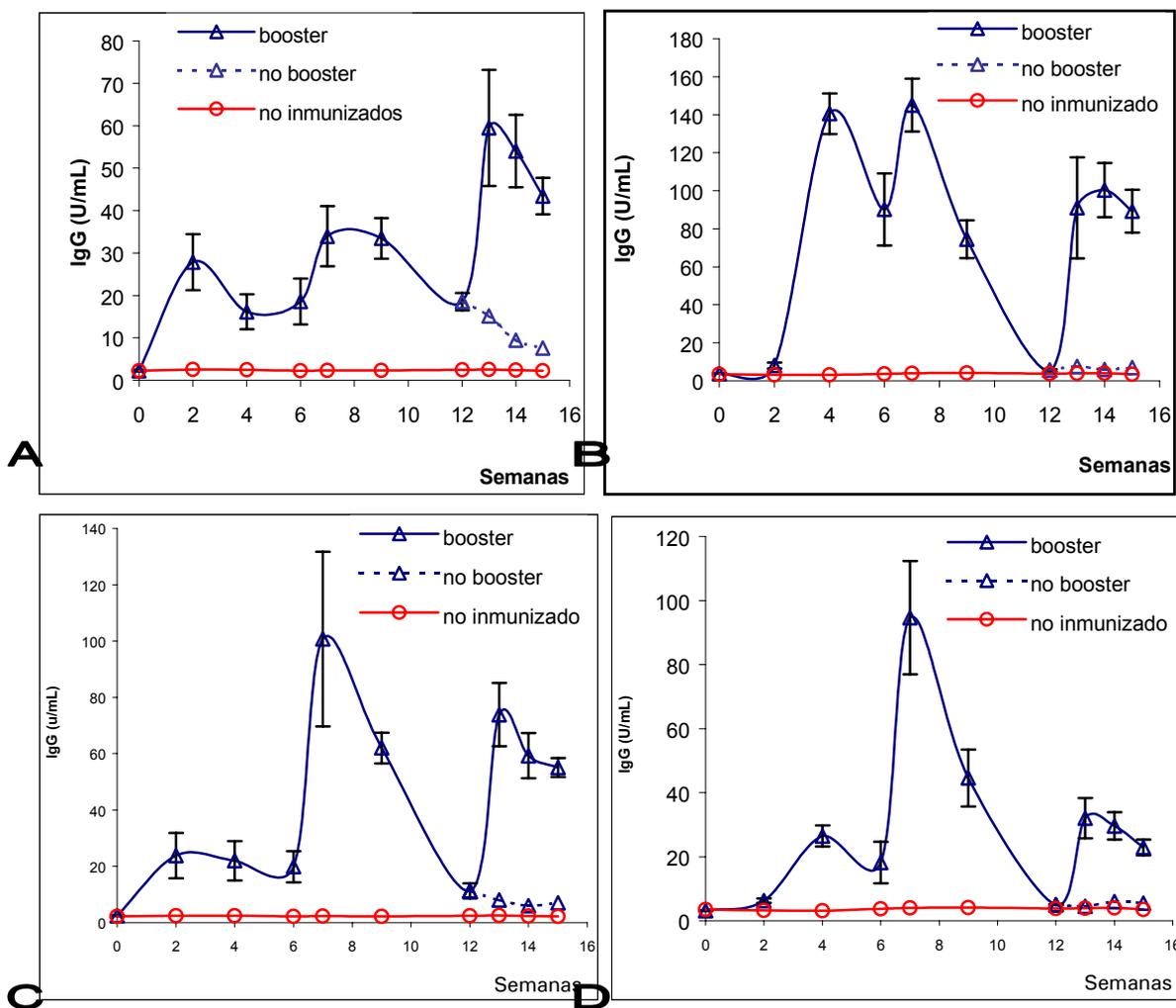
Al evaluar la protección cruzada conferida por vax-SPIRAL® frente a *Ballum* se apreció un 100% de protección en los animales inmunizados frente a la infección letal y el estado de portador independientemente de la cepa de *L. Ballum* utilizada y de la dosis de reto aplicada. Todos los animales inmunizados con la vacuna trivalente y retados con *L. Ballum* sobrevivieron al reto heterólogo con 100 o 10 000 DL₅₀ de ambas cepas de *Ballum* utilizadas en el estudio. En ningún caso se apreció síntomas característicos de infección en órganos diana (hígado y riñón) como endurecimiento, hemorragias o ictericia, ni crecimiento de leptospiras en los cultivos de órganos realizados.

La aplicación de una única dosis de vacuna monovalente de *Ballum*, tras 6 semanas de completado el esquema de vax-SPIRAL® indujo en los animales un rápido y elevado incremento de la actividad IgG específica a *Ballum* (Figura 2A). Este típico efecto de respuesta humoral secundaria tras la primera dosis con antígeno vacunal homólogo logró un incremento de los niveles de IgG específica superior a aquellos logrados con una o dos dosis de antígenos heterólogos.

La inmunización con *Ballum* en animales vacunados con vax-SPIRAL® indujo además un efecto *booster* o refuerzo de la respuesta humoral específica a los tres serogrupos vacunales, determinando un rápido y elevado incremento de la actividad IgG específica a

Canicola, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona* (Figuras 2B-D), aunque la magnitud de esta respuesta heteróloga fue inferior a la lograda tras dos dosis de inmunógeno homólogo.

Figura 2. Efecto *booster* de una inmunización con vacuna monovalente de *Ballum*, tras 6 semanas de culminado el esquema de vax-SPIRAL®, sobre la inmunidad frente a *Ballum* (A), *Canicola* (B), *Icterohaemorrhagiae* (C) y *Pomona* (D).



Discusión

Aunque la inmunidad conferida por las vacunas antileptospirósicas disponibles en la actualidad es serogrupo/serovar específica, estudios recientes demuestran la capacidad de proteínas altamente conservadas de establecer una cierta protección

cruzada entre serogrupos diferentes (1, 3, 4).

Los resultados obtenidos sugieren una importante comunidad antigénica entre el serogrupo *Ballum* y al menos uno de los tres serogrupos componentes de la vacuna trivalente vax-SPIRAL®, lo cual determina la inducción de una fuerte inmunidad cruzada con

capacidad protectora frente a la infección experimental con *Ballum* en hámsters inmunizados con la vacuna trivalente. Estos resultados en el modelo animal están en correspondencia con la elevada eficacia global que muestra vax-SPIRAL® en humanos en el terreno. De esta forma los casos confirmados de infección por *Ballum* en personas vacunadas pudieran asociarse al establecimiento de una ineficiente inmunidad en estas personas, a la pérdida de la capacidad de protección cruzada durante el período posvacunación o a la no-existencia de una fiel correlación entre la protección cruzada lograda en el modelo animal y la conferida a humanos vacunados. No obstante, un 60,4% de eficacia global tras un año de vigilancia epidemiológica posvacunación en humanos (8) avalan los resultados de protección cruzada obtenidos en el modelo animal tras 14 días de culminado el esquema de inmunización.

La aplicación de una vacuna monovalente de *Ballum* en animales inmunizados con vax-SPIRAL® no solo indujo un efecto *booster* sobre la inmunidad cruzada a *Ballum* ya establecida por la vacuna trivalente, sino además reforzó la respuesta humoral a los tres serogrupos vacunales.

La célula de *Leptospira* es un complejo multiantigénico conformado por antígenos serogrupo/serovar específicos y por otros altamente conservados en la especie o el género (1). Tras la inmunización con dos dosis de células completas de los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona* se genera una respuesta de anticuerpos dirigida a uno y otro tipo de antígenos, aún cuando la fracción predominante de anticuerpos va dirigida a epítopes específicos de estas serovariedades (1, 15, 16). Al aplicar una tercera dosis vacunal con un serogrupo diferente se producirá una respuesta primaria frente a los antígenos específicos de este serogrupo, sin embargo persistirán en el organismo animal células de memoria sensibles a antígenos compartidos con los serogrupos componentes de vax-SPIRAL®, las cuales generarán un rápido y elevado incremento de anticuerpos al ponerse en contacto con estos antígenos altamente conservados. Esta misma respuesta secundaria deberá generarse tras una infección natural heteróloga en el período posvacunación; de esta forma, el animal inmunizado estará mejor protegido frente a una infección heteróloga mientras mayor sea la memoria

inmunológica a antígenos conservados, lo cual dependerá en gran medida del establecimiento de una eficiente inmunidad como resultado de la vacunación. El establecimiento de una ineficiente inmunidad tras la inmunización con células completas de *Leptospira* repercutirá no solo en la capacidad de protección homóloga sino también en la posible protección heteróloga que la vacuna aplicada pueda conferir.

Como resultado del presente estudio se demuestra que la vacuna trivalente vax-SPIRAL® establece una fuerte inmunidad cruzada con completa protección frente a *Ballum* en hámsters, al menos tras 14 días de completado el esquema de inmunización. Asimismo, una apropiada inmunización con vacuna monovalente de *Ballum* en animales vacunados con vax-SPIRAL® refuerza la inmunidad frente a los cuatro serogrupos de *Leptospira* de mayor circulación en humanos en Cuba.

Referencias

1. Levett P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14 (2): 296-326.
2. Bulach D.M., Kalambaheti T., de la Pena-Moctezuma A. and Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000; 2 (4):375-380.
3. Sonrier C., Branger C., Michel V, Ruvoen-Clouet N., Ganiere J. And Andre-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine.* 2000; 19:86-94.
4. Branger C., Sonrier C., Chatrenet B., Klonjowski B., Ruvoen-Clouet N., Aubert A., Andre-Fontaine G. and Eliot M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect. Immun.* 2001; 69 (11):6831-6838.
5. Bedevía A. Disminuye en grupos de riesgo cifras de morbilidad por *Leptospira*. Boletín epidemiológico semanal del IPK. 1999; 9 (32):49.
6. Martínez R., Pérez A., Baró M., Alvarez M., Menéndez J., Díaz M., Cruz R., De los Reyes G., Montoya B., Sierra G., Armesto M., Saltarén A. and Sabournín O. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. *Rev. Panam. Salud Pública.* 2000; 8(6):385-392.
7. Rodríguez I., Rodríguez J., Fernández C., Obregón A., Victoria B. Leptospirosis humana en Cuba. Un acercamiento al conocimiento de sus principales reservorios. *Boletín Epidemiológico Semanal del IPK.* 2002; 12 (1).

8. Instituto Finlay. Registro Médico-Sanitario vax-SPIRAL[®] (Vacuna antileptospirósica trivalente), Ciudad de La Habana, Cuba; 1998.
9. Terpstra W.J., Hartskeerl, R.A., Smits, H.L. and Korver, H. International Course in Laboratory Techniques for the Diagnosis of Leptospirosis. Royal Tropical Institute, Amsterdam, 2000.
10. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. W.H.O: Geneva, 1982.
11. Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, Labrador I, Álvarez E. Estandarización de la dosis letal 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev. Cub. Med. Trop.* 1998; 50 (1):22-26.
12. González M., Naranjo M., Rodríguez R., Bebelagua Y., Oliva R., Batista N., González I., Izquierdo L. y Sierra G. Vacuna Antileptospirósica trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. *VacchiMonitor.* 1997; 6 (12):2-10.
13. Naranjo M., Rodríguez Y., Oliva R., Jauregui U. y González M. Esquemas de inmunización en hámsters frente al preparado vacunal antileptospirósico cubano. *Acta Farm. Bonaerense* 1999; 18: 121-126.
14. Cole J.R., Sulzer C.R. and Pursell A.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Microbiol.* 1973; 5: 65-69.
15. Midwinter A., Faine S. and Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. *J. Med. Microbiol.* 1990; 33: 199-204.
16. Cinco M., Delneri D. and 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.

Booster effect of an active immunization with *Leptospira interrogans* serogroup *Ballum* in hamsters vaccinated with vax-SPIRAL[®]

Abstract

The cross immunity and protective capacity of vax-SPIRAL[®] against *Leptospira interrogans* serogroup *Ballum*, as well as the effect of an active immunization with a *Ballum* monovalent vaccine in animals previously vaccinated with vax-SPIRAL[®] were evaluated in hamsters. Specific IgG response against *Ballum*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* and *Pomona*, induced after each immunization was determined by means of a quantitative ELISA. Heterologous protection by vax-SPIRAL[®] against a challenge with 100 and 10 000 LD₅₀ of two clinical and highly virulent serogroup *Ballum* strains was also evaluated. Fourteen days after immunization, the trivalent vaccine induced 100% of *Ballum* specific IgG seroconversion and complete cross-protection against lethal infection and prevalence of leptospires in liver and kidney. A single dose of *Ballum* monovalent vaccine six weeks after vax-SPIRAL[®] immunization induced a booster effect on specific immunity against the four most prevalent human *Leptospira* serogroups in Cuba.

Keywords: *Leptospira*, Cross immunity, vax-SPIRAL[®], *Ballum*