

Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga de un candidato vacunal tetravalente de *Leptospira*, para uso veterinario

Yaritzza Cuba-Romero,^{1*} Noemi Gainza-Santos,¹ Alfredo Saltaren-Cobas,² Mariela Naranjo-Medina³

¹ Laboratorio de *Leptospira* del Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana. Cuba.

² Facultad de Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echevarría. Boyeros, La Habana, Cuba.

³ Instituto Finlay de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa, La Habana, Cuba.

email: marielanmar@finlay.edu.cu

La inmunogenicidad es un parámetro importante en estudios de inmunógenos. En la leptospirosis la respuesta inmune humoral es vital para la resistencia a la infección, de ahí que este trabajo se haya propuesto evaluar la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga de un candidato tetravalente que incluye al serogrupo Ballum en su formulación. Se trabajó con la cepa 245-12 clasificada como *L. borgpetersenii* serovar Ballum, aislada a partir de un caso confirmado de leptospirosis. Con esta cepa previamente caracterizada desde el punto de vista de su virulencia, se formularon 5 lotes de una preparación vacunal tetravalente, la cual contiene además las cepas Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona contenidas en la vacuna Polivalente-*Leptospira*, de uso veterinario. Se evaluó la inmunogenicidad de esta preparación, mediante microaglutinación y la capacidad de protección homóloga en hámster sirio dorado, frente al reto con 100 DL₅₀. Los animales se inmunizaron con dos dosis de la vacuna (0,1mL) con un intervalo de 15 días, el reto se llevó a cabo a los 14 días de concluido el esquema de inmunización. Los resultados obtenidos se compararon con los de la vacuna Polivalente-*Leptospira*. Todos los lotes de preparación tetravalente formulados cumplieron satisfactoriamente con los controles de calidad. Los lotes formulados en este estudio mostraron una significativa inmunogenicidad y capacidad de protección homologa frente al serogrupo Ballum, y lograron eliminar el estado de portador en los animales inmunizados. El presente trabajo, por primera vez, sienta las bases para formulaciones vacunales novedosas, en animales, conteniendo el serogrupo Ballum.

Palabras clave: *Leptospira*, vacunas, inmunogenicidad, Ballum.

Introducción

El hombre y los animales padecen de igual manera la leptospirosis siendo esta una de las zoonosis más desatendidas en el mundo (1).

La inmunogenicidad es uno de los parámetros más importantes en el estudio de inmunógenos, por lo que el desarrollo de una inmunidad duradera en el tiempo es uno de los elementos más importante en la vacunología profiláctica. Para este propósito es elemental contar con cepas que cumplan todos los requisitos para la formulación de candidatos vacunales, de modo que le brinde a la especie inmunizada, la protección necesaria contra la enfermedad (2). La respuesta inmune humoral durante la leptospirosis es importante para la resistencia a la infección. Dicha inmunidad parece depender de la producción de anticuerpos aglutinantes y opsónicos, ambos dirigidos contra los determinantes antigénicos serovar o serogrupo específicos (3). La inmunidad pasiva transferida mediante el suero de individuos vacunados

puede ser conferida solamente por anticuerpos, aunque se reconoce también el papel que puede jugar la respuesta inmune mediada por células (4).

En Cuba se produce y aplica una vacuna antileptospirósica polivalente diseñada para establecer protección en los animales con alto riesgo, cuya composición por dosis de vacuna (0,1mL) es de 2,5-3,0 x 10⁸ células enteras/mL de *Leptospira* de los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok, inactivadas por calor, 2-8 mg/mL de gel de hidróxido de aluminio y 0,015% de tiomersal; la cual ha tenido un papel importante en el control y reducción de la morbilidad de la leptospirosis animal en todo el país.

Durante los estudios preclínicos de esta vacuna en modelos animales se pudo comprobar que la formulación propuesta era inmunogénica y capaz de proteger contra las cepas vacunales altamente virulentas. Los estudios anatomopatológicos y toxicológicos evidenciaron la inocuidad y la no toxicidad del producto. Esta vacuna cubana (Polivalente-*Leptospira*) induce una

* Doctora, Master en Veterinaria, especialista del Laboratorio de Leptospira, LABIOFAM. La Habana, Cuba.

protección de un año contra los serovares incluidos en la formulación.

En Cuba, en los casos confirmados de los últimos cinco años, se observó que los serogrupos de *Leptospira* predominantes fueron Ballum, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Sejroe y Pyrogenes (5). Estudios epidemiológicos, realizados anteriormente en 7 provincias del país, indicaron la existencia de al menos ocho serogrupos no incluidos en la formulación vacunal actual y cuya incidencia constituye un problema epidemiológico (6). De estos serogrupos no presentes en la vacuna Polivalente-*Leptospira*, Ballum fue la principal causa de aislamientos clínicos en todo el país en el periodo 2005-2009 (7).

Según el último reporte de serotipificación de leptospiras del año 2011, brindado por el Centro de Referencia Nacional de Leptospirosis, del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), continúan siendo los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Canicola y Pomona los principales causantes de la leptospirosis animal y humana. No obstante, en los últimos años el serogrupo Ballum se ha situado como el primer causante de la morbilidad y la mortalidad por leptospirosis, de ahí la necesidad de incluirlo en las formulaciones actuales con el objetivo de proporcionar protección contra el mismo en las especies vacunadas.

Este trabajo tiene como propósito la evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga de un candidato vacunal tetravalente de *Leptospira*, para uso veterinario, que incluya al serogrupo Ballum, en el biomodelo hámster sirio dorado.

Materiales y Métodos

Para la realización de este estudio se utilizó la cepa 245-12 *L. borgpetersenii* serovar Ballum, la cual fue seleccionada a partir de cuatro aislamientos caracterizados fenotípicamente en los Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos LABIOFAM (2). Estos aislamientos provenían de pacientes con síntomas y signos compatibles con una leptospirosis, enviados desde el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de la provincia de Holguín. Además se emplearon las tres cepas vacunales 87, 169 y 108 de los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente, que componen la vacuna Polivalente-*Leptospira*, para uso veterinario, producida por LABIOFAM. Estas se aislaron originalmente a partir de un material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de

la provincia La Habana y fueron donadas por el Instituto Finlay a LABIOFAM. Todas las cepas se aislaron por hemocultivo en el medio Korthof.

Las cepas se conservaron en el medio semisólido Fletcher a 28-30 °C (8) y se mantuvieron siempre mediante cultivos semanales en el medio proteico Korthof, bajo condiciones estáticas a 28-30 °C en el Departamento de Microbiología de LABIOFAM. La virulencia de las cepas vacunales y de la cepa 245-12 *L. borgpetersenii* serovar Ballum se mantuvo a través de pases periódicos en hámsteres, según los métodos descritos (9).

Elaboración de los candidatos vacunales tetravalentes

Para obtener la formulación vacunal tetravalente, se inactivaron los inóculos de cada cepa por calor a 60 °C durante 1 h, en baño de María. Las células se colectaron por centrifugación a 1000 g, mediante flujo continuo. Las células inactivadas concentradas fueron resuspendidas con una solución tamponada, y luego adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio estéril, mediante agitación lenta durante 2 h, adicionándole tiomersal como preservativo a la formulación final. Finalmente se ajustó el pH entre 7,2 y 7,6. La composición por dosis de la vacuna tetravalente (0,1 mL) fue la siguiente: 2,5-3,0 x 10⁸ células/mL, 2-8 mg/mL de gel de hidróxido de aluminio y 0,015% de tiomersal. Durante el proceso de formulación vacunal fueron realizados todos los controles establecidos según los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO). Se formularon cinco lotes del preparado vacunal tetravalente (001T, 002T, 003T, 004T y 005T). Aquellos con resultados satisfactorios en todos los controles realizados fueron envasados asépticamente en bulbos de cristal de 10 mL con tapón de goma y retapa metálica y conservados entre 2-8 °C hasta su uso.

Animales de experimentación

Se utilizó el biomodelo animal *Mesocricetus aureatus* (hámster sirio dorado). Se emplearon animales de ambos sexos, con un peso entre 45-60 g, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba) recibidos con sus correspondientes certificados de calidad higiénico-sanitaria y genética.

Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24 °C), humedad (20-25%), ciclos alternados de luz/oscuridad de 12 h y recibieron alimentación y agua acidulada *ad libitum*. Para todos los experimentos, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en cajas metálicas y en grupos de 5 animales por caja. Todas las operaciones de esta investigación se

realizaron siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), establecidas en los PNO, elaborados por la Dirección de Calidad del Grupo Empresarial LABIOFAM y se tuvieron en cuenta las normas y regulaciones bioéticas vigentes tanto nacionales como internacionales (10).

Inmunización

En los ensayos de inmunización se utilizaron los cinco lotes del candidato vacunal tetravalente de los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* y *Ballum* y la vacuna Polivalente-*Leptospira*. La composición por dosis de cada vacuna fue la descrita anteriormente. El esquema utilizado fue de dos dosis de 0,1mL, por vía intramuscular en la cara interna de cada extremidad posterior de los animales, separadas por un intervalo de dos semanas. Para el estudio de protección se inmunizaron 150 animales con la vacuna tetravalente (30 animales por lote) y 25 con la vacuna Polivalente-*Leptospira*. Para el estudio de inmunogenicidad se inmunizaron 60 animales, 10 por cada lote de vacuna tetravalente y 10 para la vacuna Polivalente.

Desafíos

El reto se realizó 14 días después de completados los esquemas de inmunización, por vía intraperitoneal con 100 DL₅₀ de las cuatro cepas correspondientes como dosis de reto y se empleó 0,20 mL como volumen de inóculo. Se utilizaron 5 animales por cepa.

Los animales se observaron durante 14 días, evaluándose la aparición de signos clínicos que indicaran la presencia de la enfermedad como: piloerección, excitabilidad, ictericia de piel y mucosas, hemorragias a través de los orificios naturales, postración y muerte. Para expresar la mortalidad en por ciento se utilizó la siguiente fórmula: Mortalidad % = (Número de animales muertos) x 100/ Total de animales inoculados

Evaluación de la capacidad protectora homóloga, así como la eliminación del estado de portador inducido por las preparaciones tetravalentes en hámster sirio dorado

La evaluación de la capacidad protectora homóloga de los cinco lotes del candidato vacunal tetravalente se determinó mediante la cuantificación de los animales sobrevivientes al reto para todas las cepas del estudio. Se retaron 120 animales con las cuatro cepas en estudio (20 inmunizados con cada lote de vacuna tetravalente y 20 no inmunizados), cinco animales por cepas. Paralelamente se retaron los 15 animales inmunizados con la vacuna Polivalente-*Leptospira* contra las cepas

homólogas. Como criterio de eficacia del ensayo se tomó el 80% de supervivencia de los animales inmunizados contra el 20% de sobrevida en los no vacunados.

Los animales inoculados se observaron durante los 14 días posteriores al reto y se evaluó la prevalencia de *Leptospira* en órganos. Como control de inocuidad de los lotes del candidato vacunal se tomaron cinco grupos, de 10 animales, inmunizados con cada lote de preparación vacunal tetravalente y no retados. La DL₅₀ de las cepas utilizadas en el reto se corroboró 15 días antes del ensayo y se repitió paralelamente al mismo, con el objetivo de asegurar las dosis empleadas.

Prevalencia de *Leptospira* en los órganos

Los estudios anatomopatológicos se realizaron por los métodos convencionales, utilizando las técnicas descritas para la eutanasia (11) y para la necropsia (12). Además, se realizaron observaciones macroscópicas de los órganos in situ. Para determinar la presencia de *Leptospira* en los principales órganos considerados como diana de la enfermedad leptospirósica (hígado y riñón) se tomaron muestras de los animales que sobrevivieron al reto (sacrificados a los 14 días después del reto) y del grupo no inmunizado.

Las muestras se sembraron en medio líquido Korthof y se incubaron a 28-30 °C durante 60 días, evaluándose periódicamente el crecimiento mediante la observación en microscopio de campo oscuro (13). Finalmente los cultivos positivos fueron confirmados por caracterización fenotípica. El estudio se realizó por triplicado.

Evaluación de la inmunogenicidad de los lotes del preparado vacunal en hámster sirio dorado, mediante la prueba de aglutinación microscópica

Para la evaluación de la inmunogenicidad se inmunizaron seis grupos de 10 animales cada uno, cinco grupos con cada lote de preparación tetravalente (001T, 002T, 003T, 004T y 005T) y otro con la vacuna Polivalente-*Leptospira*, según se describe en el acápite de inmunización. Se tomaron muestras de sangre en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 post inoculación. Como controles se utilizaron 10 animales no inmunizados, a los cuales se les realizó simultáneamente las mismas extracciones de sangre.

La extracción de sangre se realizó mediante punción retro orbital, utilizando capilares heparinizados. Las muestras de sangre obtenidas se incubaron durante 1 h a 37 °C; posteriormente se centrifugaron a 3000 g durante

10 min para la extracción del suero. Todas las alícuotas se conservaron a -20 °C hasta su evaluación.

Los niveles de aglutininas específicas alcanzados fueron determinados mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT, por sus siglas en inglés), empleando como antígenos aglutinantes las células enteras inactivadas y lavadas de las cepas 245-12, 87, 169 y 108, utilizadas para la elaboración de cada variante de vacuna. Para la realización del MAT se emplearon placas COSTAR® de 96 pocillos con fondo en U. Primeramente se adicionó 50 µL de tampón fosfato salino (TFS) (pH 7,2-7,4) a todos los pocillos, luego al primer pocillo de cada fila se le añadió 40 µL de TFS, hasta completar un volumen final 90 µL. Seguidamente al primer pocillo de cada fila se le adicionó 10 µL de los sueros a evaluar (un suero por fila) quedando un volumen final de 100 µL y una dilución de 1:10.

El contenido del pocillo se homogeneizó, se tomó una alícuota de 50 µL y se vertió en el segundo pocillo, mezclando nuevamente. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar el pocillo 12, donde luego de homogeneizar se descartaron 50 µL del volumen, obteniéndose de esta manera diluciones seriadas del suero desde 1:10 hasta 1:20480. Posteriormente se le adicionó a todos los pocillos, 50 µL del cultivo en fase logarítmica de *Leptospira* del serogrupo correspondiente, crecido en el medio Korthof a 28 °C durante 3 a 7 días, con una concentración aproximada de 2×10^8 leptospiras/mL, quedando diluciones finales de 1:20 hasta 1:40960. Cada suero se evaluó con todas las cepas contenidas en la variante de vacuna utilizada para su obtención.

Como controles de las cepas se colocaron en pocillos aparte 50 µL de TFS y 50 µL de cultivo del serogrupo de referencia en cuestión. Se utilizó un suero con altos títulos de aglutininas ($\geq 1/160$) como control positivo, frente a cada serogrupo evaluado, el cual se colocó en

una fila aparte y se le realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito. De igual manera se procedió con el suero control negativo. En cada placa se montaron el control de la cepa, y los controles positivo y negativo del suero.

Finalmente las placas se homogeneizaron suavemente y se incubaron durante un periodo de 2 h a temperaturas de 28-30 °C. La lectura se realizó utilizando un microscopio con condensador de campo oscuro, empleando el ocular de 20X y el objetivo 10X.

De acuerdo con el Subcomité Taxonómico de *Leptospira*, como título se tomó la mayor dilución del suero que mostró el 50% de aglutinación, dejando el 50% de células libres en comparación con un cultivo control de la cepa correspondiente, diluido 1:2 en TFS (14).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la comparación de proporciones según la prueba de chi-cuadrado (χ^2) de dos colas en el análisis de las evaluaciones serológicas en los ensayos de inmunogenicidad y en la comparación de los porcentajes de sobrevivencia en los ensayos de protección activa. Todos los valores de p fueron de doble cola, considerándose un valor de 0,05 para indicar la significación estadística, el programa utilizado fue STATISTICA 6.0.

Resultados y Discusión

Elaboración de los candidatos vacunales

En la tabla 1 se muestran los resultados de los controles de calidad realizados a cada uno de los lotes de la preparación tetravalente. Todos los lotes cumplen satisfactoriamente los requisitos de calidad establecidos en las normas para la evaluación de la vacuna Polivalente-*Leptospira*. Como se observa en la tabla, la cantidad de tiomersal determinada

Tabla 1. Resultados de los controles de calidad realizados a los lotes de vacuna tetravalente elaborados.

Lotes	001T	002T	003T	004T	005T	Norma
Color	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
Esterilidad	estéril	estéril	estéril	estéril	estéril	estéril
Tiomersal (%)	0.001	0.0015	0.0016	0.0014	0.002	<0.015
Formol residual (mg/mL)	0.5	0.4	0.6	0.45	0.35	<0.8
Conc. Gel (mg/mL)	6.5	5.8	7.0	6.53	7.1	2-8
pH	7.35	7.37	7.34	7.4	7.42	7.2-7.6
Inocuidad	inocuo	inocuo	inocuo	inocuo	inocuo	inocuo
Potencia	100	100	100	80	100	80-100

en los lotes de preparación vacunal tetravalente se encuentra muy por debajo de lo establecido en la norma. Esto obedece a que durante el proceso de formulación, los controles de esterilidad de cada uno de los lotes mostraron resultados satisfactorios y por tanto se decidió disminuir las cantidades de este preservio, siempre respetando lo establecido en la norma para este tipo de inmunógeno.

Evaluación de la inmunogenicidad de los lotes del preparado vacunal tetravalente en hámster sirio dorado, mediante MAT

La realización de un candidato vacunal tetravalente es una nueva propuesta desarrollada a partir de la formulación original, diseñada con el objetivo de establecer protección frente a los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* y *Ballum*. Este candidato se desarrolló siguiendo los mismos procedimientos de producción de la vacuna existente con la única diferencia que se incluye un nuevo serogrupo, y por consiguiente una representación menor de la cantidad de cada uno de los antígenos originalmente presentes, de forma tal que se mantiene la concentración total del principio activo (células enteras inactivadas) presente en la preparación original ($2,5-3,0 \times 10^8$ células/mL).

Los resultados de la comparación de los niveles de aglutininas específicas inducidos por las preparaciones tetravalentes y la vacuna polivalente frente a los antígenos homólogos en los diferentes grupos de animales evaluados, mediante MAT, se muestran en la tabla 2.

Al evaluar mediante MAT los niveles de aglutininas específicas inducidos por las preparaciones vacunales tetravalentes frente a los antígenos homólogos (cepas *Ballum*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*) dos semanas después de la inmunización, se apreció que en el 100% de los animales de los grupos inmunizados se alcanzaron títulos por $\text{MAT} \geq 1:320$ contra los antígenos testados, mientras que los títulos previos a la primera dosis vacunal fueron menores que 1:2, al igual que en los animales controles no inmunizados (Tabla 2). Los títulos de aglutininas aumentaron ligeramente tras la primera dosis para luego incrementarse significativamente ($p < 0,05$) después de la segunda inmunización hasta alcanzar de manera general títulos máximos de 1:20480.

Se observó una respuesta significativa frente a *Ballum* y *Canicola* aún con la primera dosis, pero *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona* presentan una respuesta mayor solo después de la segunda inmunización, alcanzando en el caso de *Icterohaemorrhagiae* valores aproximados a los de *Canicola* y *Ballum* al final del

estudio, no siendo así para *Pomona* donde los niveles permanecen más bajos. De forma general se comprobó un 100% de seroconversión. En el grupo control no inmunizado no se observó en ninguno de los casos respuesta de anticuerpos.

Los niveles de anticuerpos frente a los serogrupos *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* en los animales inmunizados con los lotes del candidato tetravalente fueron ligeramente inferiores a los obtenidos comúnmente en animales inmunizados con la vacuna polivalente frente a estos serogrupos. Este comportamiento pudiera estar debido a la baja concentración de antígenos serogrupo/serovar específicos presentes en esta preparación en comparación con la vacuna Polivalente-*Leptospira*.

La preparación vacunal tetravalente evaluada contiene $2,5-3 \times 10^8$ células/mL, dividida entre los cuatro serogrupos que conforman la formulación. Esta misma carga antigénica total está distribuida en la vacuna Polivalente-*Leptospira* de igual forma entre los tres serovares. Sin embargo para *Pomona*, la respuesta fue más pobre, manteniendo títulos significativamente menores que los generados históricamente para este serovar con dicha vacuna polivalente.

Estos resultados demuestran que las cargas antigénicas de las cepas vacunales *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* presentes en esta nueva formulación son suficientes y reproducen de manera general un patrón de respuesta similar a los que históricamente se han obtenido con la vacuna Polivalente-*Leptospira*.

Así mismo la carga de epítopes B del serogrupo *Ballum* también resulta eficaz, pues reproduce este patrón de respuesta. Solo en el caso de *Pomona* esta carga antigénica parece resultar insuficiente, lo que pudiera estar influenciando en los bajos títulos encontrados para este serogrupo con relación al resto, donde la carga antigénica también es baja con relación a la vacuna polivalente, pero existe mayor comunidad antigénica entre estos tres serogrupos y no de ellos con *Pomona* lo que pudiera provocar un efecto sinérgico en la respuesta de los primeros (15).

La evaluación mediante MAT de la respuesta de aglutininas específicas inducidas por ambas preparaciones frente a los antígenos homólogos reveló una seroconversión significativa ($T_9/T_0 \geq 1:1024$). Todos los lotes tetravalentes indujeron un incremento significativo de títulos de aglutininas específicas frente al antígeno de *Ballum* posterior a la primera y segunda dosis ($p < 0,05$).

Tabla 2. Resultados de los niveles de aglutininas específicas inducidas por las preparaciones vacunales tetravalentes y polivalente frente a los antígenos homólogos, evaluados mediante MAT.

Preparación vacunal	Antígeno utilizado	Semanas								
		0	7	14	21	28	35	42	49	56
Tetravalente lote 001T	<i>L. Ballum</i>	-	1:640	1:320	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	1:20480
	<i>L. Ictero.</i>	-	1:320	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:1024	1:20480
	<i>L. Canicola</i>	-	1:320	1:160	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:10240	1:10240
Tetravalente lote 002T	<i>L. Pomona</i>	-	1:80	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
	<i>L. Ballum</i>	-	1:320	1:160	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480
	<i>L. Ictero.</i>	-	1:320	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:10240	1:10240
Tetravalente lote 003T	<i>L. Canicola</i>	-	1:320	1:160	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:10240	1:20480
	<i>L. Pomona</i>	-	1:80	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
	<i>L. Ballum</i>	-	1:320	1:160	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480
Tetravalente lote 004T	<i>L. Ictero.</i>	-	1:320	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:10240	1:20480
	<i>L. Canicola</i>	-	1:320	1:160	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:10240	1:10240
	<i>L. Pomona</i>	-	1:40	1:20	1:80	1:160	1:320	1:320	1:640	1:1280
Tetravalente lote 005T	<i>L. Ballum</i>	-	1:640	1:320	1:1280	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:10240
	<i>L. Ictero.</i>	-	1:320	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:10240	1:20480
	<i>L. Canicola</i>	-	1:320	1:160	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:10240	1:10240
Polivalente	<i>L. Pomona</i>	-	1:80	1:40	1:80	1:160	1:320	1:1280	1:2560	1:2560
	<i>L. Ictero.</i>	-	1:640	1:320	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	1:20480
	<i>L. Canicola</i>	-	1:640	1:320	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	1:20480
Control	<i>L. Ballum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. Ictero.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. Canicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. Pomona</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los valores representan la media de tres determinaciones

Evaluación de la capacidad protectora homóloga y eliminación del estado de portador inducido por los lotes de preparación tetravalente en hámster sirio dorado

Durante la evaluación de la capacidad protectora homóloga de los preparados vacunales tetravalentes en hámster frente al reto con 100 DL₅₀ de las cepas homólogas *Canicola*, *Ballum* e *Icterohaemorrhagiae* se apreció un 100% de protección en los animales inmunizados contra la infección letal tras 15 días de culminado el esquema de inmunización (Tabla 3). Para *Pomona* estos resultados fueron más controversiales.

Los resultados de la protección inducida para el serogrupo *Pomona*, aunque satisfactorios, son más bajos que los

encontrados para el resto de los serogrupos incluidos en la preparación tetravalente, corroborando los resultados encontrados en el estudio de la inmunogenicidad. Estos resultados nos hacen pensar que la inclusión de un nuevo serogrupo a la formulación y por consiguiente una representación menor de la cantidad de cada uno de los antígenos originalmente presentes por dosis de vacuna, unido a la poca comunidad antigénica entre el serogrupo *Pomona* y el resto de los serogrupos, provoca que la carga antigénica de *Pomona* sea insuficiente para lograr una protección similar, en hámster, a la inducida en la vacuna Polivalente-*Leptospira*.

Estos resultados evidencian que existe un cierto correlato entre los niveles de aglutininas específicas

Tabla 3. Resultados del reto en hámsteres vacunados con los lotes del preparado vacunal tetravalente, frente a 100 DL₅₀ de las cepas homólogas altamente virulentas.

Preparado vacunal	Cepa de reto	Inmunizados	No inmunizados
		n =10	n = 10
Tetravalente Lote 001T	<i>Leptospira</i> Ballum Ballum	100*	0
	<i>Leptospira</i> Canicola Canicola	100*	0
	<i>Leptospira</i> Pomona Mozdok	80*	0
	<i>Leptospira</i> Ict. Copenhageni	100*	0
Tetravalente Lote 002T	<i>Leptospira</i> Ballum Ballum	100*	0
	<i>Leptospira</i> Canicola Canicola	100*	0
	<i>Leptospira</i> Pomona Mozdok	100*	0
	<i>Leptospira</i> Ict. Copenhageni	100*	0
Tetravalente Lote 003T	<i>Leptospira</i> Ballum Ballum	100*	0
	<i>Leptospira</i> Canicola Canicola	100*	0
	<i>Leptospira</i> Pomona Mozdok	80*	0
	<i>Leptospira</i> Ict. Copenhageni	100*	0
Tetravalente Lote 004T	<i>Leptospira</i> Ballum Ballum	100*	0
	<i>Leptospira</i> Canicola Canicola	100*	0
	<i>Leptospira</i> Pomona Mozdok	80*	0
	<i>Leptospira</i> Ict. Copenhageni	100*	0
Tetravalente Lote 005T	<i>Leptospira</i> Ballum Ballum	100*	0
	<i>Leptospira</i> Canicola Canicola	100*	0
	<i>Leptospira</i> Pomona Mozdok	80*	0
	<i>Leptospira</i> Ict. Copenhageni	100*	0
Polivalente-Leptospira	<i>Leptospira</i> Canicola Canicola	100*	0
	<i>Leptospira</i> Pomona Mozdok	100*	0
	<i>Leptospira</i> Ict. Copenhageni,	100*	0

%S: porcentaje de sobrevivencia

*: Diferencia estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los animales inmunizados y sus controles

inducidas y la protección frente al reto con cepas homólogas. Las cargas antigénicas de las cepas Canicola e Icterohaemorrhagiae y del propio serogrupo Ballum son altamente inmunogénicas y suficientes para inducir una protección similar a la encontrada en la vacuna polivalente.

Las vacunas antileptospirósicas de células enteras han sido por lo general muy eficaces en la protección contra la infección letal en los animales inmunizados, aunque esta protección tiene una limitada duración y es restringida a la serovariedad componente y aquellas antigénicamente relacionadas (16). Sin embargo, al evaluar la eficacia de una vacuna antileptospirósica se debe distinguir entre la protección contra la infección letal (muerte) y la protección contra el establecimiento del estado de portador (infección de órganos y leptospiuria) (17).

La ausencia de enfermedad en los animales inmunizados no excluye la posibilidad de que estos sean portadores asintomáticos y diseminadores del patógeno a través de la orina. En animales como el ganado vacuno o porcino el estado de portador crónico asintomático puede extenderse durante años, constituyendo importantes fuentes de infección para otros animales y el hombre (4). Por tal motivo el establecimiento de una eficaz protección no solo contra la infección letal sino además contra el estado de portador, debe caracterizar a una buena vacuna profiláctica contra la leptospirosis.

El análisis de la protección de los candidatos vacunales contra el establecimiento del estado de portador se realizó mediante el cultivo, en el medio Korthof, de los órganos diana de la infección leptospirósica (hígado y riñón) provenientes de todos los animales sobrevivientes al

Tabla 4. Valores de DL₅₀ alcanzados en el estudio.

Cepas	Valores de DL ₅₀ de los experimentos individuales		Valores promedios
	Antes	Después	DL ₅₀ (±DS)
Canicola	13	15	14±2,28
Ictero.	12	14	13±1,09
Pomona	23	25	24±2,28
Ballum	15	14	14±1,78

DL₅₀: Dosis letal media

DS: Desviación estándar

reto. Esta metodología es considerada lo suficientemente sensible para evaluar la protección contra el estado de portador conferida por vacunas antileptospirósicas (17) y además ha sido correlacionada con estudios histopatológicos como tinción de Warthin-Starry, tinción con plata o inmunofluorescencia (18). Los resultados obtenidos revelaron la ausencia de signos característicos de la infección como endurecimiento, hemorragias o ictericia en todos los animales inmunizados. El cultivo de varias secciones de los órganos en medio proteico Korthof demostró ausencia de crecimiento microbiano tras 60 días de incubación, lo que demuestra que las formulaciones vacunales desarrolladas son completamente efectivas en la erradicación del estado de portador frente a las cepas homólogas.

Estos resultados de total protección contra el estado de portador frente a los retos homólogos pueden estar dados por la adyuvación y la inmunidad celular potenciada por el gel de hidróxido de aluminio, adyuvante de depósito que potencia tanto la inmunidad humoral como celular (19) y ha demostrado ser un componente clave en formulaciones antileptospirósicas que protegen contra el estado de portador en animales (11).

En este sentido es importante destacar que la mayoría de los candidatos vacunales más contemporáneos, generados a partir de proteínas extracelulares, no han logrado establecer protección contra el estado de portador aún cuando han protegido en alguna medida contra la infección letal (20).

Estos resultados vienen a ratificar la idea acerca de la importancia de la adyuvación y la importancia de la inmunidad celular para la erradicación del estado de portador. Este estado, determinado fundamentalmente por las características anatómicas de los órganos inmuno-privilegiados permite el aislamiento de las leptospiras del sistema inmune y en especial de la respuesta humoral, de ahí la importancia de estimular

la respuesta celular innata para la eliminación de estos microorganismos.

De forma general, los animales que no sobrevivieron el reto murieron entre el cuarto y séptimo día. Los primeros signos clínicos se observaron a partir de las 72 h posteriores al reto. Desde el punto de vista clínico y anatomopatológico macroscópico, presentaron signos y lesiones que avalaron el cuadro de la enfermedad leptospirósica, así como graves daños característicos en los órganos diana como el hígado y el riñón y las hemorragias pulmonares, entre otras.

En la tabla 4 se muestran los valores de las DL₅₀ individuales (antes y durante el experimento) y el promedio, para cada una de las cepas evaluadas. Como puede observarse, todas las cepas necesitaron solamente inóculos por debajo de aproximadamente 24 leptospiras para producir la infección y posteriormente la muerte de los animales inoculados.

Conclusión

Los preparados vacunales tetravalentes obtenidos a partir de la cepa *L. borgpetersenii* serovar Ballum, mostraron una significativa inmunogenicidad y capacidad de protección homóloga en el biomodelo animal, así como lograron eliminar el estado de portador. Se evidenció que la protección homóloga contra el serovar Mozdok en la preparación tetravalente, aunque satisfactoria es de menor cuantía, probablemente debido a la interferencia del serovar Ballum.

Referencias

1. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curren Topics in Microbiology and Immunology* 2015;387:65-97.
2. Cuba Y, Gainza N, Batista N, Saltaren A, Naranjo M. Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* para su uso en vacunas veterinarias. *VacciMonitor* 2016;25(1):5-11.

3. Levett P. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):296-326.
4. Adler B, de la Peña M. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 2009;2:4382-92.
5. Cruz R. Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis. Informe del Programa de Zoonosis, Resultados 2010. Ciudad de la Habana: MINSAP; 2010.
6. Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Zamora Y. Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 2007;59(1):11-4.
7. Rodríguez I, Fernández C, Obregón A, Zamora Y, Rodríguez J, Rodríguez N, et al. Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis en Cuba (2006-2008). En: *Leptospirosis Habana* 2009, 8-12 de Junio 2009. La Habana: Cuba; 2009:6-9.
8. Fletcher W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1928;21:265-82.
9. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: W.H.O; 1982.
10. Montenegro S, Gayol M, Torres M. Aspectos Éticos de la investigación con animales. *Rev. Med. Rosario* 2011;77:69-74.
11. Capó M. Bioética Animal: Desarrollo de un Concepto. *Animales de Experimentación. La Revista Hispanoamericana* 1999;5(2):30-40.
12. Castillo F. El ratón como animal de laboratorio. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 1985.
13. Naiman BM, Blumerman S, Alt D, Bolin C, Brown R, Zuerner R, et al. Evaluation of Th1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo: Involvement of WC1(+) $\gamma \delta$ and CD4 T cells. *Infect Immun* 2002;70(11):6147-57.
14. Organización Mundial de la Salud. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa–VP/OPS/OMS; 2008.
15. Naranjo M. Evaluación microbiológica e inmunológica de cepas de *Leptospira*. Vacuna contra la leptospirosis conteniendo el serovar Ballum. Saarbrücken: Editorial Académica Española; 2016.
16. Martínez R, Pérez A, Baró M, Álvarez M, Menéndez J, Díaz M, et al. Evaluación de la eficacia de una nueva vacuna contra la leptospirosis humana en grupos de riesgo. *Rev Panam Salud Pública* 2000;8(6):385-92.
17. Babudieri B, Castelli M, Pisoni F. Comparative test with formalized and irradiated vaccines against leptospirosis. *Bull Wld Hlth Org* 1973;48:587-90.
18. Barnett J, Barnett D, Bolin C, Summers T, Wagar E, Cheville N, et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun* 1999;67:853-61.
19. Krishnan L, Dicaire C, Patel G, Sprott G. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum. *Infect Immun* 2000;68:54-63.
20. Silva E, Santo C, Athanazio D, Seyffert N, Seixas F, Cerqueira GM, et al. Characterization of virulent of *Leptospira* isolates in hamster model. *Vaccine* 2008;26:3892-6.

Evaluation of immunogenicity and protective homologous capacity of a tetravalent *Leptospira* vaccine candidate, for veterinary use, including serogroup Ballum

Abstract

Immunogenicity is an important parameter for studies of immunogens. The humoral immune response against leptospirosis is vital for resistance to the infection; hence this paper is proposed to evaluate the immunogenicity and protective homologous capacity of a tetravalent candidate that includes serogroup Ballum in its formulation. The strain 245-12 classified as *L. borgpetersenii* serovar Ballum was used in this paper, isolated from a confirmed case of leptospirosis. Five (5) batches of a tetravalent vaccine preparation were formulated with this strain previously characterized from the point of view of its virulence, which also contains the strains Canicola, Icterohaemorrhagiae and Pomona contained in the Polyvalent-*Leptospira* vaccine for veterinary use. The immunogenicity of this preparation was assessed by micro agglutination and homologous protection capacity in Golden Syrian Hamster before the challenge with 100 LD₅₀. Animals were immunized with two doses of vaccine (0.1 mL) with an interval of 15 days; the challenge was carried out 14 days after the immunization schedule was ended. The results were compared with those obtained with the Polyvalent-*Leptospira* vaccine. All the batches of the tetravalent preparation formulated complied satisfactorily with the quality controls. The batches formulated in this study showed a significant immunogenicity and homologous protection capacity against serogroup Ballum and they were able to eliminate the carrier state in the immunized animals. This paper, for the first time sets the bases for novel vaccine formulations, in animals, containing the serogroup Ballum.

Keywords: *Leptospira*, vaccines, immunogenicity, Ballum.
