

# Caracterización de cepas de *Leptospira Ballum* aisladas de casos clínicos. Inmunidad cruzada en hámsters vacunados con vax-SPIRAL®

✉ Marta González<sup>1</sup>, Níurka Batista<sup>1</sup>, Mayrel Machado<sup>1</sup>, Osvaldo Savournin<sup>2</sup>, Alfredo Saltarén<sup>2</sup>, Angela Sanamé<sup>2</sup>, Isabel Ochoa<sup>2</sup>, Yoandra Rodríguez<sup>1</sup>, Mariela Naranjo<sup>1</sup>, Yolanda Valdés<sup>1</sup>, Irma González<sup>1</sup>, Gustavo Sierra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros, Instituto Finlay  
Ave. 27 No. 19805, La Lisa, AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba  
Fax: (53-7) 336075; E-mail: martaglez@finlay.edu.cu

<sup>2</sup>Laboratorio de *Leptospira* del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Holguín, Cuba

## RESUMEN

En este estudio fueron obtenidas 10 cepas de *Leptospira* aisladas de casos clínicos en la provincia de Holguín con vistas a la producción de vacunas mono o polivalentes contra la leptospirosis humana y clasificadas mediante la técnica de Microaglutinación (MAT), usando para ello antisueros de referencia policlonales y monoclonales. La virulencia, inmunogenicidad y potencia de estas cepas se estudió en el modelo animal Hámster Sirio, evaluándose la respuesta humoral inducida mediante la técnica de MAT. La inmunidad cruzada entre serovares del serogrupo *Ballum* y los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok*, componentes de vax-SPIRAL®, fue definida mediante la prueba de potencia al vacunar hámsters con la referida vacuna y retarlos con 10 000 DL<sub>50</sub> de cada una de las cepas de los serovares arriba descritos, 21 días después de aplicada la 2ª dosis. De las 10 cepas estudiadas, 3 pertenecieron al serogrupo *Pomona* serovar *mozdok* y 7 al serogrupo *Ballum*, perteneciendo 2 al serovar *arborea* y 5 al serovar *ballum*, demostrándose su virulencia, inmunogenicidad y potencia. Se demostró la existencia de inmunidad cruzada al obtener un 100% de sobrevivencia en los animales vacunados y retados con respecto a un 80-100% de mortalidad en los animales controles no vacunados.

**Palabras claves:** *Leptospira Pomona*, *Leptospira Ballum*, clasificación, virulencia, inmunogenicidad, protección cruzada

*Biotecnología Aplicada* 2004;21:77-81

## ABSTRACT

**Characterization of *Leptospira Ballum* strains isolated from clinical cases. Cross immunity in Hamsters vaccinated with vax-SPIRAL®.** In order to obtain *L. Ballum* strains for the production of mono or polyvalent vaccines against human leptospirosis, 10 clinical strains isolated in Holguín, Cuba, were evaluated. They were classified by means of Microagglutination test (MAT) using policlonal and monoclonal reference antibodies. Virulence, immunogenicity and potency were studied in Syrian Golden Hamster model. Humoral immune response was evaluated by MAT. Cross immunity between the serovar of *L. Ballum* serogroup and the serovars *canicola*, *copenhageni* and *mozdok*, components of vax-SPIRAL®, was define by means of the potency assay in vaccinated hamsters, challenged with 10 000 DL<sub>50</sub> of virulent strains of the serovars above described, 21 days after the second dose. The results showed that 3 strains belonged to serogroup *Pomona* serovar *mozdok* and 7 strains to serogroup *Ballum*, belonging 2 to serovar *arborea* and 5 to serovar *ballum*. The virulence, immunogenicity and potency was demonstrated. The existence of cross protection was demonstrated. There was observed 100% of survival in vaccinated animals in respect with 80-100% of mortality in non vaccinated animals.

**Keywords:** *Leptospira Pomona*, *Leptospira Ballum*, classification, virulence, immunogenicity, cross protection

## Introducción

La leptospirosis es una de las zoonosis de más amplia distribución mundial, y la causa de numerosas pérdidas económicas y humanas [1, 2]. El agente causal es *Leptospira* patógena, el cual tiene como principal vector a los roedores [4]. En la actualidad coexisten la clasificación serológica y la genética, esta última reconoce la existencia de 16 especies genómicas y más de 180 serovares [3, 5, 6].

En nuestro país no es hasta finales de la década de 1980 y principios de la de 1990 que esta enfermedad adquiere una tendencia ascendente, por lo que se decide iniciar las investigaciones encaminadas a la producción de la primera vacuna cubana contra la

leptospirosis humana, vax-SPIRAL® [7, 8]. Esta vacuna tuvo en su composición cepas de los serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok*, que eran las de mayor circulación en el país en aquel entonces [9]. El año 1994 fue el más crítico, reportándose 2828 casos de leptospirosis, con una tasa de incidencia de 25.5 x 100 000 habitantes y 52 fallecidos [7]. A partir de 1992 comienzan a diagnosticarse los primeros casos de leptospirosis humana ocasionada por el serogrupo *L. Ballum*, por investigadores del Laboratorio de *Leptospira* del Instituto Finlay. Este serogrupo es en la actualidad uno de los de mayor incidencia, conjuntamente con los serogrupos *L.*

1. Skilbeck N. Bovine Leptospirosis: Microbiological and Histological findings in cattle at slaughter. Aust Vet Jour 1988; 65 (3):73-5.

2. Farr RW. Leptospirosis. Clin Infect Dis 1995; 21:1-6.

3. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001;14 (2):296-326.

4. OPS. El control de las Enfermedades Transmisibles en el Hombre. Informe oficial de la Asociación Americana de Salud Pública. Oficina Panamericana. Oficina Regional de la OMS. Washington; 1985.

*Pomona* y *L. Canicola*, en las provincias centrales y orientales del país [10].

Los estudios de efectividad de vax-SPIRAL® [11], tuvieron como escenario la provincia de Holguín, en la que los estudios serológicos evidenciaron una incidencia del serogrupo *L. Ballum* de un 42%, *L. Pomona* un 41% y *L. Canicola* un 13%. Esta situación inmunoepidemiológica representó un reto para la vacuna, puesto que este serogrupo estaba ausente en la formulación. Los reportes de la literatura plantean que la inmunidad a la leptospirosis parece depender de la producción de anticuerpos aglutinantes y opsonicos, dirigidos fundamentalmente contra antígenos serovar o serogrupo específicos [12, 14]. Sin embargo, es bueno destacar que existen reportes acerca de la existencia de inmunidad cruzada entre serogrupos diferentes [15, 17]. No obstante, los resultados obtenidos en el ensayo clínico mostraron un 97% de efectividad [11], pudiéndose inferir la existencia de una protección cruzada contra el serogrupo *L. Ballum*.

Teniendo en cuenta la importancia de este serogrupo en la situación tanto inmunoepizootiológica como inmunoepidemiológica de la leptospirosis en nuestro país, se iniciaron por primera vez los estudios de caracterización de cepas de *L. Ballum* aisladas de casos clínicos en humanos en esa provincia. Estos servirían de base a su posible inclusión en la formulación vacunal ya existente o nuevas formulaciones, según las necesidades que puedan presentarse en las diferentes regiones del país. Además, uno de los objetivos fundamentales de este trabajo fue evaluar la posible existencia de inmunidad cruzada entre las cepas vacunales y serovares del serogrupo *L. Ballum* en estudios de laboratorio en el modelo animal Hámster Sirio.

## Materiales y Métodos

### Cepas

Se trabajaron 10 cepas aisladas de casos clínicos, procedentes de personas no vacunadas incluidas en el estudio de Efectividad de la Vacuna Antileptospirosis Trivalente vax-SPIRAL®, desarrollado en la provincia de Holguín entre 1996 y 1997. Las cepas fueron aisladas mediante hemocultivo utilizando para ello el medio Kortoff [18]. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente y se chequearon quincenalmente al microscopio de campo oscuro para valorar la presencia de *Leptospira*. vax-SPIRAL®, lote 6002

Componentes básicos por dosis de 0.5 mL

Células de <i>L. Canicola</i> serovar <i>canicola</i>	50-80 x 10 <sup>6</sup>
Células de <i>L. Icterohaemorrhagiae</i> serovar <i>copenhageni</i>	50-80 x 10 <sup>6</sup>
Células de <i>L. Pomona</i> serovar <i>mozdok</i>	50-80 x 10 <sup>6</sup>
Hidróxido de Aluminio	1.00 mg
Tiomersal	0.05 mg
Solución Salina tamponada con fosfatos (SSTF), CSP*	0.5 mL

\*Cantidad suficiente para

### Vacuna

#### Condiciones de cultivo

Las cepas recepcionadas fueron subcultivadas en el medio de cultivo Tween-Albúmina (TA) [19] a 28 °C durante 7 días en estacionario, en tubos de 16 x 150 mm con 10 mL de medio, utilizando un inóculo al 10%.

### Evaluación de la virulencia

Las cepas se inocularon por vía intraperitoneal (IP) en el modelo animal Hámster Sirio. El cultivo se ajustó a 75 x 10<sup>6</sup> células/mL, mediante conteo en cámara de Petroff Hausser, inoculándose 8 animales por cepa con 0.8 mL (60 x 10<sup>6</sup> células), 0.4 mL (30 x 10<sup>6</sup> células), 0.1 mL (7.5 x 10<sup>6</sup> células) y 0.05 mL (3.75 x 10<sup>6</sup> células) cada dos animales respectivamente. Los hámsters fueron observados durante 14 días, registrándose las muertes ocurridas por día.

### Clasificación y selección de las cepas de trabajo

La clasificación se realizó mediante la técnica de Microaglutinación (MAT) [20] empleando antisueros policlonales y monoclonales de referencia provenientes del Laboratorio de Referencia de Leptospirosis de la OMS, Holanda.

Los criterios de selección de las cepas de trabajo se basaron en los resultados de la clasificación y magnitud de la virulencia de las mismas.

### Sueros policlonales de referencia:

Suero contra la cepa *Hond Utrech* serogrupo *Canicola* serovar *canicola*. Suero contra cepa M-20 serogrupo *Icterohaemorrhagiae* serovar *copenhageni*. Suero contra cepa Mus 120 serogrupo *Ballum* serovar *ballum*. Suero contra cepa *pomona* serogrupo *Pomona* serovar *pomona*.

### Anticuerpos Monoclonales (AcM) empleados

Serogrupo	AcM
<i>L. Canicola</i>	F 152C2, F 152C8
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	F 70C7, F 70C24
<i>L. Pomona</i>	F 46C5, F 46C9, F 58C2
<i>L. Ballum</i>	F 74C1, F 74C7

### Preparación del antígeno

Las cepas seleccionadas fueron crecidas en medio TA a 28 °C durante 7 días en zaranda. Al cabo de este tiempo se realizaron los controles de viabilidad, esterilidad y virulencia correspondientes. Los cultivos fueron inactivados con formaldehído tamponado con fosfatos al 0.5% concentración final durante 30 minutos. Luego se centrifugaron a 10 000 g, durante 30 minutos y se lavaron tres veces con Tampon Fosfato Salino (TFS) estéril pH 7.2. La concentración del antígeno se ajustó mediante conteo en cámara de Petroff Hausser a 200 x 10<sup>6</sup> células/mL. Los antígenos así preparados fueron denominados variantes antigénicas (V1, V2, V3 y V4).

### Esquema de inmunización

Diez hámsters de 40-80 g de peso corporal fueron inoculados por vía IP con 1 mL de cada una de las variantes antigénicas correspondientes. Se aplicaron 5 dosis con un intervalo de 5 días entre dosis. Los animales fueron muestreados antes de la aplicación de cada dosis y 5 días después de la última inoculación, mediante toma de sangre del plexo retroorbital. La sangre de los 10 animales inoculados por cada variante fue mezclada y centrifugada a 3500 g durante 10 minutos. Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su evaluación.

### Evaluación de la respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral se evaluó mediante MAT. Se utilizaron como antígenos las mismas cepas escogidas

5. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:47-415.

6. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt cAG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:839-58.

7. Raúl CP, Salabarría LG, Blanco MO, Machado FO, Obregón AM, Alvarez SR, Martínez SR, González GM y col. Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis Humana. MINSAP 1998; 1-46 Seruimpres.

8. Martínez RS, Cruz RP, López CA. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la Leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 1993;45:32-41.

9. González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, González I, Izquierdo L, Sierra G. Vacuna antileptospirosis trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios sanos. *Vacimonitor* 1997;Año 6 (12):2-10.

10. Rodríguez I, Rodríguez JE, Fernández C, Obregón AM, Victoria B. Leptospirosis humana en Cuba. Un acercamiento al conocimiento de sus principales reservorios. Conferencia presentada en la Reunión Científica Internacional Leptospirosis 2001. La Habana, Cuba. Mayo 17-8, 2001.

11. Martínez SR, Pérez SA, Baró SM, Baly A, Díaz GM, Sierra GG, Cruz de la Paz R, Montoya B, De los Reyes G, González SA, Savournin O, Saltaren A, Alvarez AM, Menéndez HJ. Evaluación Parcial de la Efectividad de la vacuna contra la leptospirosis humana vax-SPIRAL en grupos de riesgo de la Provincia de Holguín-Cuba. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases Published by CONTEXTO, 1997:Vol 1 Supplement 1.

12. Adler B, Ballard SA, Miller SJ, Faine S. Monoclonal antibodies reacting with serogroup and serovar specific epitopes on different lipopolysaccharide subunits of *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. *Microbiol. Immunol.* 1989;1(4):213-8.

13. Jost BH, Adler B, Faine S. Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. *J. Med. Microbiol.* 1989;29:115-20.

14. 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;89:287-98.

15. Kemeses K. Cross-Immunity Studies on Virulent Strains of *Leptospira* Belonging to Different Serotypes. *Z. Immun. Allerg Forsch* 1964;127:209-29.

antes descritas, garantizando que las mismas tuvieran un crecimiento homogéneo, sin la presencia de aglutinaciones inespecíficas y ausencia de contaminantes. Se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros a evaluar desde 1:10 hasta 1:20480 en TFS pH 7.2 para un volumen final de 50  $\mu$ L, utilizando para ello placas de poliestireno de 96 pocillos. Como control positivo se emplearon antisueros de referencia y como control negativo del experimento el mismo antígeno diluido en TFS. Las muestras de suero fueron mezcladas con 50  $\mu$ L del antígeno e incubadas a 37 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo fueron observadas al microscopio de campo oscuro. El título de los sueros se definió como la mayor dilución a la que se obtuvo un 50% de aglutinación con respecto al control negativo.

### Evaluación de la protección inducida

De los 10 animales inmunizados con las diferentes variantes, 5 fueron retados con 10 000 DL<sub>50</sub> de la cepa homóloga [21] 21 días después de la última inoculación. Se retaron además el mismo número de animales controles no inmunizados. Los hámsters fueron observados durante 14 días y se registraron las muertes ocurridas en este período de tiempo [22-23]. La prueba se consideró válida cuando sobrevivieron 80% de los vacunados mientras que no menos del 80% debió sobrevivir al reto, todo esto dentro del transcurso de los 14 días del reto [24].

### Ensayo de inmunidad cruzada

Se vacunaron 25 hámsters de 40-80g de peso con el Lote 6002 de vax-SPIRAL®. Se aplicaron dos dosis de 0.5 mL por vía intramuscular (IM) en la cara interna de las extremidades posteriores, con un intervalo de seis semanas entre dosis. Como controles del ensayo se utilizaron 25 animales sin vacunar. Los animales se distribuyeron en grupos de cinco por caja. Veintiún días después de aplicada la 2<sup>a</sup> dosis los hámsters fueron retados con 10 000 DL<sub>50</sub> de cepas virulentas pertenecientes a los serovares *canicola*, *copenhageni*, *mozdok*, así como a los serovares *ballum* (cepa 60) y *arborea* (cepa 63). Los animales se observaron durante 14 días y se registraron las muertes.

## Resultados

### Virulencia de las cepas trabajadas

Alta virulencia (AV), 100% mortalidad hasta la dosis de 0.1-0.05 mL. Medianamente virulenta (MV) 100% mortalidad hasta la dosis de 0.4 y baja virulencia (BV) 50-100% de mortalidad en la dosis de 0.8 mL.

### Clasificación y evaluación de la virulencia

De los 10 aislamientos recepcionados, tres correspondieron al serogrupo *Pomona* serovar *mozdok* y siete al serogrupo *Ballum* serovares *ballum* y *arborea* (Tabla 1). Las tres cepas pertenecientes al serogrupo *Pomona* resultaron ser muy estables en cultivo y altamente virulentas. Sin embargo, en las cepas pertenecientes al serogrupo *Ballum* la virulencia no se comportó de igual forma, resultando ser incluso una de ellas baja virulenta. Para estudios posteriores se seleccionaron las cepas 59, 60, 63 y 64 por su alta virulencia.

Tabla 1. Resultados de la clasificación por Microaglutinación de las cepas 59, 60, 63 y 64 usando antisueros de referencia policlonales y monoclonales así como de la evaluación de su virulencia en el modelo animal Hámster Sirio

No. de orden	Clasificación			Virulencia
	Serogrupo	Serovar	Título por MAT frente a Mab	
30	<i>Pomona</i>	<i>mozdok</i>	1:10240	AV
50	<i>Pomona</i>	<i>mozdok</i>	1:20480	AV
56	<i>Pomona</i>	<i>mozdok</i>	1:10240	AV
58	<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>	1:10240	BV
<b>59</b>	<b><i>Ballum</i></b>	<b><i>ballum</i></b>	<b>1:20480</b>	<b>AV</b>
<b>60</b>	<b><i>Ballum</i></b>	<b><i>ballum</i></b>	<b>1:20480</b>	<b>AV</b>
<b>63</b>	<b><i>Ballum</i></b>	<b><i>arborea</i></b>	<b>1:5120</b>	<b>AV</b>
<b>64</b>	<b><i>Ballum</i></b>	<b><i>arborea</i></b>	<b>1:10240</b>	<b>AV</b>
65	<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>	1:20480	MV
66	<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>	1:20480	MV

MAT: Ensayo de Microaglutinación

AV: Altamente virulenta, MV: Medianamente virulenta, BV: Baja virulenta

En negrita las cepas de trabajo seleccionadas por pertenecer al serogrupo *L. Ballum* y además por haber resultado AV

El comportamiento de la mortalidad en los animales inoculados con las cepas de los serovares *ballum* y *arborea* aparece reflejado en la Figura 1. Como se puede observar en todos los casos no hubo un incremento gradual en la mortalidad en función de la dosis aplicada, lo cual fue más representativo para las cepas 60 y 63.

### Inmunogenicidad

En la Figura 2 se muestran los resultados de la evaluación por MAT de la respuesta de aglutininas específicas en suero de hámsters inoculados con las cuatro variantes estudiadas: V1 (cepa 59), V2 (cepa 60), V3 (cepa 63) y V4 (cepa 64). Todas las cepas resultaron ser inmunogénicas. La respuesta de anticuerpos aglutinantes comenzó a detectarse luego de la aplicación de tres dosis para las variantes V2 y V4, y de cuatro dosis para V1 y V3, llegándose a obtener títulos elevados de 1:5120 frente a V1 y V4 y de 1:1280 para V2 y V3.

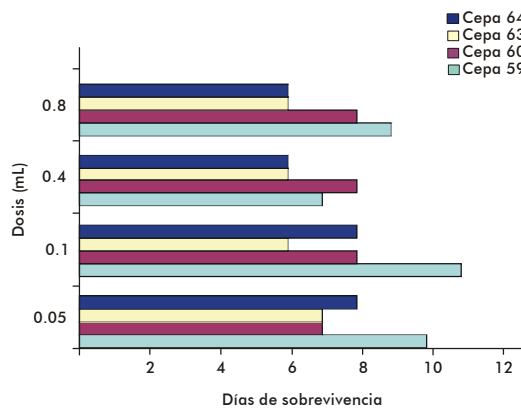


Figura 1. Resultados de la virulencia de las cepas de *L. Ballum* serovar *ballum* (cepas 59 y 60) y *L. Ballum* serovar *arborea* (cepas 63 y 64) en el modelo animal Hámster Sirio. Se inocularon dos animales por dosis de 0.8 mL, 0.4 mL, 0.1 mL y 0.05 mL respectivamente para cada una de las cepas. Los animales fueron observados durante 14 días, registrándose las muertes ocurridas por día.

16. Plesko I, Lataste-Dowle C. Immunité croisée en leptospirose expérimentale. Effets protecteurs reciproques realises par des souches *grippophyphosa* et des souches d'autres serogroupes. Annales de L'Institut Pasteur 1970;Tome 119.

17. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, Andre-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine 2000;19:86-94.

18. Korthof G. Experimentelles schlammfieber beim menschen. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig. 1932;125:429.

19. Ellinghausen HC, Mc.Cullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes, fractionation of oleic albumin complex and a medium of albumin and polysorbate 80. Am. J. Vet. Res. 1965;26:45-51.

20. Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the microscopic agglutination test. Applied Microbiol. 1973;5:65-9.

### Protección inducida

Los hámsters inmunizados con las cuatro variantes fueron retados 21 días después de la última inoculación con 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas homólogas. Los resultados aparecen reflejados en la Tabla 2. Las variantes V1, V2 y V3 lograron proteger al 100% de los hámsters contra el reto letal con la cepa homóloga. Con respecto a V4 no puede darse un resultado concluyente puesto que los animales controles no inmunizados sobrevivieron al reto. Esto indica que la cepa 64, perteneciente al serovar *arborea*, perdió su virulencia durante los subcultivos en el medio TA.

### Inmunidad cruzada

Cincuenta hámsters inmunizados con vax-SPiRAL<sup>®</sup> fueron retados en grupos de 10 con 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas altamente virulentas de los serovares componentes de vax-SPiRAL<sup>®</sup> (*canicola*, *copenhageni* y *mozdok*), así como de los serovares *ballum* y *arborea* aisladas de los casos clínicos. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El 100% de los hámsters inmunizados sobrevivieron al reto tanto homólogo como heterólogo, mientras que hubo entre 80 y 100% de mortalidad en los controles no inmunizados.

### Discusión

El período de vigilancia epidemiológica durante el ensayo de efectividad de vax-SPiRAL<sup>®</sup> trajo consigo el diagnóstico de leptospirosis humana, teniendo en cuenta tanto los antecedentes epidemiológicos como los exámenes de laboratorio. En estos últimos estaban incluidos el hemocultivo y los estudios serológicos, el aislamiento del microorganismo es el elemento confirmativo por excelencia en la definición de un caso positivo de leptospirosis [11]. Este diagnóstico nos permitió contar con la información real de qué serogrupo era el de mayor incidencia en la región en estudio, elemento fundamental en el análisis final de la efectividad de la vacuna.

De las 10 cepas incorporadas en este estudio encontramos que el serogrupo *Ballum* representó el 70% de los aislamientos, mientras que el serogrupo *Pomona*, solamente el 30%. Las cepas pertenecientes al serogrupo *Ballum* fueron clasificadas por MAT mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos de serovar. Los resultados indicaron que pertenecían a los serovares *ballum* y *arborea*. Este constituyó un resultado novedoso, puesto que estos serovares no habían sido reportados con anterioridad en humanos en nuestro país. No obstante, sí encontramos coincidencia con lo reportado en estudios epizootiológicos en el mismo período [25]. Estos investigadores lograron realizar aislamientos de *Leptospira* de los serovares *ballum* y *arborea* principalmente en ratas. De estos resultados se puede inferir que esta especie representó el reservorio por excelencia de estos serovares y por tanto la principal fuente de transmisión de la leptospirosis causada por *L. Ballum* para el hombre.

Las cepas del serogrupo *Pomona* resultaron pertenecer al serovar *mozdok*, que está incluido en la formulación de vax-SPiRAL<sup>®</sup>. En los estudios previos de laboratorio con las cepas vacunales, realizados durante el proceso de producción de vax-SPiRAL<sup>®</sup>, nos encontramos que este serogrupo se caracterizó siempre

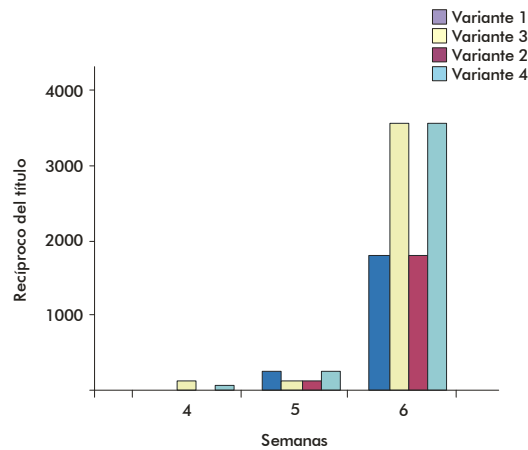


Figura 2. Resultados de la titulación por Microaglutinación de los sueros de hámsters inoculados con las cuatro variantes antigénicas, frente a su cepa homóloga: Variante 1 (cepa 59), Variante 2 (cepa 60), Variante 3 (cepa 63), Variante 4 (cepa 64). Se utilizó como control de la cepa la solución salina tamponada con fosfatos.

por su estabilidad y alta virulencia [23]. Estas características están presentes en los tres aislamientos realizados en este estudio.

Con respecto a los estudios de virulencia de las cepas del serogrupo *Ballum* observamos un comportamiento diferente, pues no todas fueron altamente virulentas. Además no hubo correspondencia entre la dosis inoculada y el tiempo de sobrevida de los hámsters.

Se debía esperar que la inoculación de concentraciones superiores del microorganismo determinara la muerte más temprana, pero esto no ocurrió con todas las cepas evaluadas. Este comportamiento ha sido reportado por otros investigadores, los cuales han observado que dosis

Tabla 2. Resultados del reto de los hámsters inmunizados con las variantes antigénicas de *L. Ballum* Variante 1 (cepa 59), Variante 2 (cepa 60), Variante 3 (cepa 63) y Variante 4 (cepa 64) frente 10 000 DL<sub>50</sub> de sus cepas homólogas

Variante antigénica	Cepas de reto	Animales inmunizados	Controles no inmunizados
		n=3	n=3
		%S	%S
V1	59	100	0
V2	60	100	0
V3	63	100	0
V4	64	100	100

%S por ciento de sobrevivencia

Tabla 3. Resultados del reto de hámsters vacunados con vax-SPiRAL<sup>®</sup>, Lote 6002, frente a 10 000 DL<sub>50</sub> de cepas virulentas pertenecientes a los serovares *canicola*, *copenhageni*, *mozdok*, *ballum* (cepa 60) y *arborea* (cepa 63)

Grupo (n=10)	Serovar de reto	Vacunados	No vacunados
		n=5	n=5
		%S	%S
I	<i>canicola</i>	100	20
II	<i>copenhageni</i>	100	20
III	<i>mozdok</i>	100	0
IV	<i>ballum</i>	100	0
V	<i>arborea</i>	100	0

%S por ciento de sobrevivencia

21. Reed J, Muench C. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. Am. J. Hyg. 1938;27:493-7.

22. Russell CJ, VG Harris. Antileptospiral Activity of Serum. II Leptospiral Virulence Factor. J Bacteriol 1967;93(2):513-9.

23. Oliva R, JF Infante, M González. Pathological-Clinical Characterization of Leptospirosis in Golden Syrian Hamster Model. Arch. Med. Res. 1994; 25 (2):165-70.

24. European Pharmacopoeia suppl. 1977;vol. III.

altas de *Leptospira* inoculadas en hámsters no han desarrollado la infección renal, a diferencia de dosis más bajas [16]. Ellos infieren que a concentraciones altas del germen se induce una respuesta de anticuerpos específicos que puede determinar un aumento en el tiempo de aparición de los primeros síntomas de la enfermedad y en algunos casos la sobrevivencia de estos animales. Estos elementos por su importancia serán objeto de estudio en futuros ensayos.

De las cepas pertenecientes al serogrupo *Ballum*, fueron seleccionadas cuatro (59, 60, 63 y 64) porque resultaron ser altamente virulentas. La virulencia es una de las características fundamentales que debe presentar una cepa de *Leptospira* para poder ser considerada como posible cepa vacunal, puesto que se ha demostrado que la protección inducida por cepas no virulentas es menor que la inducida por cepas virulentas [17]. No obstante, la cepa 64 perdió su virulencia durante pases sucesivos en el medio TA. Este evento ha sido reportado anteriormente por otros autores y es característico de los subcultivos de *Leptospira*, lo que hace necesario el pase del microorganismo por animal para mantener o recuperar su virulencia [26].

Estas cepas demostraron su capacidad inmunogénica y protectora durante los ensayos realizados en hámsters. El ensayo de Microaglutinación evidenció que las variantes evaluadas lograron inducir elevados títulos de anticuerpos aglutinantes y proteger a los animales inmunizados frente al reto letal con cepas virulentas de los serovares *ballum* y *arborea*. Se ha reportado que uno de los mecanismos que participan en la protección contra la leptospirosis es la aglutinación mediada por anticuerpos IgM e IgG. En virtud de esta relación podemos inferir que la respuesta de aglutininas desempeñó un papel fundamental en la protección de los hámsters contra el reto letal.

Se demostró además la existencia de inmunidad cruzada entre cepas de los serovares componentes de vax-SPIRAL® (*canicola*, *copenhageni* y *mozdok*) y cepas de los serovares *ballum* y *arborea*. Este hecho no ha sido reportado anteriormente para el caso de vacunas. Sin embargo, sí existen evidencias de inmunidad cruzada entre cepas virulentas de *Leptospira* pertenecientes a diferentes serogrupos en experimentos de sobreinfección en curieles, hámsters y cobayos [15,16]. Kemeses demostró en curieles la existencia de una fuerte inmunidad cruzada entre los serovares *canicola*, *ictero-haemorrhagiae* y *pomona*, así como entre los serovares *grippotyphosa* y *pomona* (o *canicola*), pero en menor grado. Este autor plantea que el establecimiento de inmunidad cruzada es evidente para serovares estrechamente relacionados desde el punto de vista antigénico, como son *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, pero puede establecerse entre serovares para los que no se haya observado relación antigénica importante por la prueba clásica de MAT, pero que compartan características biológicas similares como pueden ser la producción de hemolisinas y lipasas [15]. Plesko y Lataste-Dorolle demostraron también la existencia de protección cruzada in vivo entre algunas cepas virulentas pertenecientes a los serogrupos

*Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae* y *Canicola*. Sonrier y colaboradores [19] encontraron evidencias de protección cruzada dentro de *L. interrogans* mediante experimentos de inmunización en gerbils (*Meriones unguiculatus*). Estos autores demostraron que la protección homóloga contra cepas de los serogrupos *Icterohaemorrhagiae* y *Canicola* es inducida por antígenos lipopolisacáridicos. Sin embargo, la protección cruzada se debe a antígenos proteicos compartidos al menos entre cepas de los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Autumnalis*. Estos antígenos se expresan tanto en cepas virulentas como no virulentas de tales serogrupos, pero sus cantidades pueden variar en función de la virulencia de la cepa. Ello demuestra una vez más la importancia del factor virulencia a la hora de escoger una cepa vacunal.

Los resultados de los estudios preclínicos sobre protección cruzada coinciden con los obtenidos en el ensayo clínico de efectividad de vax-SPIRAL® en la provincia de Holguín. Al concluir el período de vigilancia epidemiológica se reportó un 93.8% de efectividad para los serogrupos *Pomona* y *Canicola*, ambos incluidos en su formulación, y un 92.5% para el serogrupo *Ballum*, que no está incluido en la misma [13]. Esto nos brinda evidencias clínicas de la existencia de una inmunidad cruzada entre los componentes de vax-SPIRAL® y el serogrupo *Ballum*. Estos resultados no coinciden con lo reportado en la literatura, donde se plantea que las vacunas existentes contra la leptospirosis establecen una protección serovar o serogrupo específica [9, 10]. Es por ello que estas vacunas se producen a partir de células completas inactivadas pertenecientes a varios serogrupos, contra los cuales se desea inducir protección [17]. Los antígenos protectores activos presentes en ellas, conocidos hasta el momento, son de naturaleza lipopolisacáridica. Sin embargo, otros antígenos como por ejemplo proteínas, podrían inducir un efecto de protección cruzada. En este hecho podría estar la explicación de la protección cruzada inducida por vax-SPIRAL®. No hemos encontrado reportes recientes de la literatura que hablen de una protección cruzada después de la vacunación. Recientemente ha sido reportado que la vacunación mediada por adenovirus con una proteína asociada a hemólisis (Hap1) induce protección cruzada en gerbils contra el reto con *Leptospira* virulenta [27].

Nos proponemos continuar los estudios con cepas pertenecientes a otros serogrupos, aisladas de casos clínicos en humanos durante los ensayos clínicos de eficacia, con vistas a evaluar su comportamiento en el laboratorio y la posible existencia de protección cruzada contra ellas. Esto nos hará contar con un mayor número de cepas que nos permita realizar una adecuada selección de las mismas para ser consideradas como posibles candidatos vacunales.

## Agradecimientos

Quisiéramos agradecer al Dr. W. Terpstra y al Dr. H. Korver del Tropical Royal Institute de Amsterdam, Holanda, por su gentil ayuda en el suministro de los sueros policlonales y anticuerpos monoclonales de referencia usados en este trabajo.

25. Teresa PP. Leptospirosis animal en Cuba. Conferencia, II Taller Internacional Leptospira' 97. Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba, (3-5 de diciembre de 1997).

26. Sebastian EH, Vet MB, Reginald H. Leptospirosis. JAVNA 1994;205(11): 518-23.

27. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, André-fontaine G, Eloit 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): 6831-8.