

Esquemas de Inmunización en hámsters frente al Preparado Vacunal Antileptospirósico Cubano

Mariela NARANJO-MEDINA ^{1*}, Yoandra RODRÍGUEZ-JÍMENEZ ¹,
Reynaldo OLIVA-HERNÁNDEZ ¹, Ulises JÁUREGUI-HAZA ² y Marta GONZÁLEZ-GONZÁLEZ ²

¹ Laboratorio de Leptospira y División de Modelos Animales, Instituto Finlay.
Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ave 27 N° 19805,
La Lisa, AP 16017, Cod 11600, La Habana, Cuba.

² Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y 21, Atabey, Playa,
Apartado Postal 16042, La Habana 11600, Cuba.

RESUMEN. Se evaluaron diferentes esquemas de inmunización con el preparado vacunal cubano contra la leptospirosis en hámsters, con el objetivo de seleccionar los parámetros óptimos para el ensayo clínico Fase II en humanos. Nueve esquemas de vacunación fueron ensayados, utilizando dos dosis de 0,25; 0,5 y 0,75 mL, con intervalos de 4, 6 y 8 semanas entre ellas. La dinámica de anticuerpos se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático. Conjuntamente se realizó un estudio de Dosis-Respuesta de la vacuna a diferentes diluciones. Los mayores niveles de inmunogenicidad se lograron con el esquema de vacunación de dos dosis de 0,5 mL con un intervalo de 6 semanas. La vacuna confirió niveles de protección elevados hasta la dilución de 1:4. De acuerdo a estos resultados proponemos el esquema de vacunación antes mencionado para los ensayos clínicos en humanos, así como la evaluación de la dosis de 0,25 mL con intervalo de 6 semanas en el ensayo clínico Fase II.

SUMMARY. "Immunisation schemes with the Cuban vaccine preparation against Leptospirosis in hamsters". Different immunisation schemes with the Cuban vaccine preparation against Leptospirosis were evaluated in hamsters, in order to choose which one is better to be evaluated in the Clinical Assay Phase II (Immunogenicity) in humans. Nine immunisation schemes were used: doses of 0.25; 0.5 and 0.75 with intervals of 4, 6 and 8 weeks between them. The immunogenicity was measured by an immunoenzymatic assay. At the same time a study of Doses-Response using different dilutions of the vaccine was performed. The highest immunogenic levels were reached with the scheme of two doses of 0.5 mL each one, separated by six weeks. The vaccine provided good protection level until the dilution of 1:4. According to this results we propose the immunisation scheme described above for clinical assays in humans, as well as to evaluate the use of two doses of 0.25 mL with a six week interval in the clinical assay Phase II.

INTRODUCCION

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por espiroquetas de la especie *Leptospira interrogans*¹. El control de esta enfermedad puede lograrse por diferentes vías: buenas prácticas de laboreo animal, control de vectores, minimizando el riesgo de exposición a *Leptospira*, quimioterapia y a través de la vacunación².

Existen numerosos reportes acerca del desarrollo de vacunas antileptospirósicas monovalentes, bivalentes y polivalentes³⁻⁸. Sin embargo las disponibles hasta el momento confieren corta inmunidad y no proveen protección cruzada contra muchos de los serovares de *L. interrogans*^{2,5,7,9}.

En los últimos años se ha producido un in-

cremento de la leptospirosis en Cuba, observándose casos no sólo en la población adulta, sino también en la infantil¹⁰. Debido a esta situación y a la necesidad de establecer un nivel adecuado de protección en todo el personal de riesgo, se desarrolló un preparado vacunal adsorbido en gel de hidróxido de aluminio, compuesto por los serogrupos de mayor incidencia en nuestro país (*L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*¹¹).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios anteriores acerca de la capacidad inmunogénica y protectora de este preparado en animales¹², se hizo necesario evaluar diferentes esquemas de inmunización con vistas a seleccionar los parámetros óptimos para el esquema

PALABRAS CLAVE: Esquema de inmunización, Inmunogenicidad, Leptospirosis.

KEY WORDS: Immunisation scheme, Immunogenicity, Leptospirosis.

* Autora a quien dirigir la correspondencia. Fax: 53(7)336075. E mail: leptosp@finlay.edu.cu.

de vacunación a proponer para el ensayo clínico Fase II (Inmunogenicidad) en humanos. De igual forma fue necesario evaluar la capacidad protectora del preparado en dosis menores a las que se habían utilizado en los ensayos de potencia. Estos constituyen los objetivos principales del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparado vacunal

Células inactivadas de *L. interrogans* serovares *canicola*, *copenhageni* y *mozdok*, adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio y ajustadas a una concentración de 80-150 células por serovar.

Esquemas de inmunización

Se tomó como referencia el esquema de dos dosis de 0,5 mL con intervalo entre ellas de 6 semanas, el cual había sido utilizado en estudios anteriores de inmunogenicidad del preparado vacunal. Se estudiaron además las dosis de 0,25 y 0,75 mL, es decir una dosis inferior y otra superior a la de referencia, así como los intervalos entre dosis de 4 y 8 semanas. En total fueron 9 esquemas evaluados:

Esquema 1: Dos dosis de 0,25 mL con un intervalo entre dosis de 4 semanas

Esquema 2: Dos dosis de 0,25 mL con un intervalo entre dosis de 6 semanas

Esquema 3: Dos dosis de 0,25 mL con un intervalo entre dosis de 8 semanas

Esquema 4: Dos dosis de 0,50 mL con un intervalo entre dosis de 4 semanas

Esquema 5: Dos dosis de 0,50 mL con un intervalo entre dosis de 6 semanas

Esquema 6: Dos dosis de 0,50 mL con un intervalo entre dosis de 8 semanas

Esquema 7: Dos dosis de 0,75 mL con un intervalo entre dosis de 4 semanas

Esquema 8: Dos dosis de 0,75 mL con un intervalo entre dosis de 6 semanas

Esquema 9: Dos dosis de 0,75 mL con un intervalo entre dosis de 8 semanas

Estudio de la respuesta de anticuerpos específicos

Para este ensayo se utilizaron 150 hámsters isogénicos de 60-90 g de peso procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). 135 animales fueron divididos en 9 grupos de 15 hámsters cada uno e inmunizados con el preparado vacunal por vía intramuscular (IM), según los 9 esquemas descritos anteriormente. Como controles fueron uti-

lizados 15 hámsters no vacunados. Se colectaron muestras semanales de sangre del plexo retroorbital durante 12 semanas, mezclándose las mismas por grupos, de forma tal que cada mezcla de sangre correspondía a 15 animales. La sangre luego de coagulada fue centrifugada a 3500 g durante 10 minutos y el suero conservado a -20 °C hasta su utilización.

Procedimiento serológico

La respuesta humoral se evaluó mediante un sistema ELISA estandarizado en nuestro laboratorio. Para el recubrimiento se utilizó un antígeno trivalente compuesto por células de los serovares *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok*. Para preparar el antígeno se partió de cultivos de 7 días en medio Tween-Albúmina¹³, los cuales fueron inactivados con formaldehído tampinado 0,5 % de concentración final y concentradas por centrifugación a 10 000 g durante 30 min. Luego se lavaron tres veces con TFS y resuspendieron en el mismo tampón para una concentración final de 200 x 10⁶ células/mL. Las suspensiones celulares fueron mezcladas para conformar el antígeno, recubriéndose las placas con 150 µL del mismo. Las muestras fueron diluidas 1:320 en TFS más 1 % de leche descremada y 0.05% de Tween 20. Se utilizó un conjugado anti IgG de hamster-peroxidasa producido en el laboratorio, diluido 1:2000 en el mismo medio de las muestras. La lectura de las muestras se realizó en un lector de ELISA (Titertek-Multiskan®) a una densidad óptica (DO) de 492 nm.

Dosis-Respuesta

Para este ensayo se utilizaron 90 hámsters, 75 fueron inmunizados en grupos de 15 con diluciones del preparado vacunal propuesto en Tampón Fosfato Salino (TFS) desde puro hasta 1:16 y 15 sirvieron como controles. La inmunización se realizó con dos dosis de 0,5 mL de cada dilución, con intervalo de seis semanas entre dosis por vía IM. Quince días después de la segunda dosis cada grupo de 15 hámsters fue retado en subgrupos de 5 con 10.000 DL50 de las cepas altamente virulentas de *L. canicola*, *L. copenhageni* y *L. mozdok* respectivamente, por vía intraperitoneal (IP)¹⁴. Además se retaron 5 animales controles por cepa. Para el cálculo de la DL50 se siguió el procedimiento descrito por Reed y Muench¹⁵. Los animales fueron observados durante 14 días registrándose el número de muertes. Para la definición de la dinámica de anticuerpos fueron tomadas muestras de sangre durante 8 semanas y evaluadas por el procedimiento serológico descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Se empleó el Test de Student de comparación de medias ¹⁶ para un nivel de significación del 95%. Todos los valores de DO fueron normalizados. Para el análisis de los datos se tomaron tres parámetros como criterio de buena respuesta en los animales inmunizados: 1) nivel máximo de anticuerpos posterior a la segunda dosis, 2) nivel de anticuerpos un mes después de aplicada la segunda dosis y 3) cantidad total de anticuerpos. Como Desviación Estándar para el análisis estadístico se tomó la dispersión entre los valores de anticuerpos basales de un total de nueve determinaciones.

RESULTADOS

Esquemas de inmunización

Los resultados obtenidos por ELISA acerca de la evaluación de la inmunogenicidad del preparado empleando diferentes dosis e intervalos entre ellas se muestran en las Figuras 1-3. En todos los casos se observó una respuesta humoral caracterizada por un aumento discreto de los niveles de IgG después de la primera dosis y un aumento sustancial de los niveles de anticuerpos tras la administración de la segunda dosis.

Se evidenció además que para un mismo intervalo entre dosis y para cada uno de los criterios analizados existen diferencias significativas entre las dosis empleadas 0,25; 0,5 y 0,75 ($t > 2.12$), siendo el mejor esquema de inmunización el de la dosis de 0,5 mL para los intervalos de 4 y 6 semanas y el de la dosis de 0,75 mL para el intervalo de 8 semanas. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos al evaluar los esquemas con los diferentes criterios escogidos.

Dosis-Respuesta

La dinámica de la respuesta de anticuerpos para cada dilución del preparado vacunal puede observarse en el Figura 4, evidenciándose en todos los casos una correspondencia entre la magnitud de la respuesta y la dilución de la vacuna inoculada. Según estos resultados por ELISA existe una similitud entre la respuesta inducida ante las diluciones 1:2 y 1:4 de la propuesta de vacuna. Sin embargo los índices de protección son superiores con la dilución 1:2, la cual se corresponde con la dosis de 0,25 mL (Tabla 2). No obstante los resultados obtenidos con la dilución 1:4 se encuentran en el límite de aceptación para la definición de satisfactorio del ensayo ¹⁴.

Intervalo entre dosis (semanas)	Dosis (mL)	Criterio 1	Criterio 2	Criterio 3
0,25	1,7460	0,9841	6,1838	
4	0,50	3,1510**	1,9583**	10,6367**
0,75	2,1025	1,3282	7,6305	
0,25	2,3666	1,3944	9,2495	
6	0,50	4,5243**	2,75**	22,1936**
0,75	2,1414	2,1337	12,2609	
0,25	1,5704	1,0134	9,5276	
8	0,50	2,1414	1,4747	10,5797
0,75	2,6256*	2,2256**	15,1187**	

Tabla 1. Valores normalizados de anticuerpos según los criterios de evaluación escogidos. Criterio 1: nivel máximo de anticuerpos posterior a la segunda dosis. Criterio 2: nivel de anticuerpos un mes después de la 2da dosis. Criterio 3: cantidad total de anticuerpos. * Diferencias significativas. ** Diferencias altamente significativas.

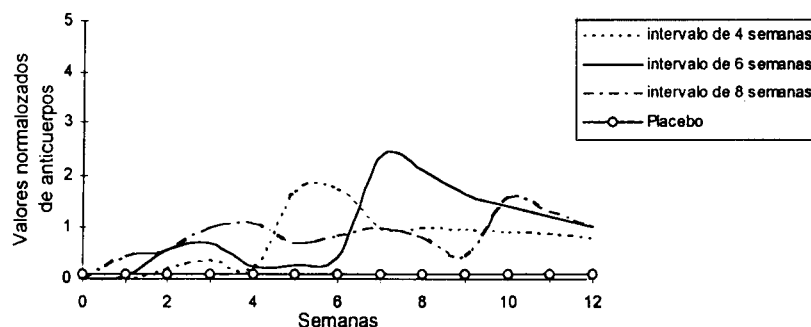


Figura 1. Dinámica de formación de anticuerpos IgG en hámsters inmunizados con dos dosis de 0,25 mL del preparado vacunal con diferentes intervalos entre dosis.

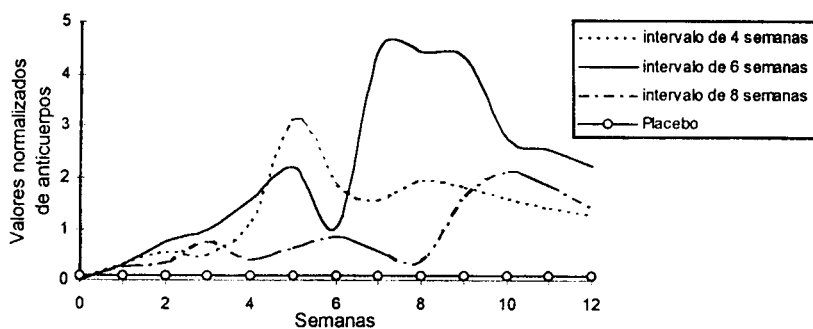


Figura 2. Dinámica de formación de anticuerpos IgG en hámsters inmunizados con dos dosis de 0,5 mL del preparado vacunal con diferentes intervalos entre dosis.

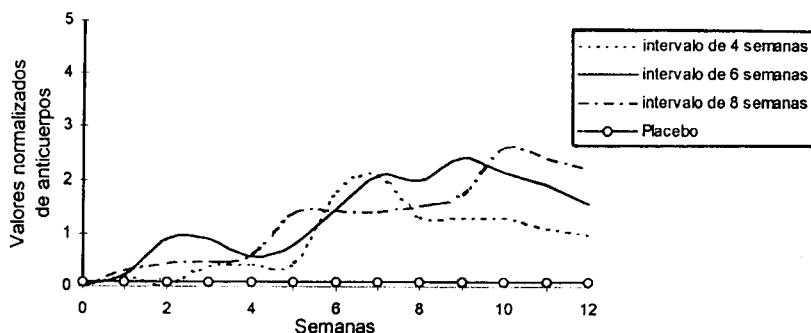


Figura 3. Dinámica de formación de anticuerpos IgG en hámsters inmunizados con dos dosis de 0,75 mL del preparado vacunal con diferentes intervalos entre dosis.

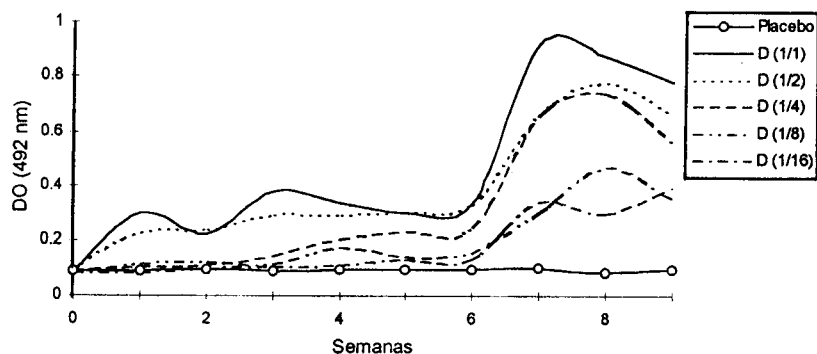


Figura 4. Respuesta de anticuerpos en hámsters inmunizados con diferentes diluciones del preparado vacunal.

Diluciones de la vacuna	Porcentaje de sobrevivencia Serovares de confrontación*		
	<i>canicola</i>	<i>copenhageni</i>	<i>mozdok</i>
puro	100	100	100
1:2	80	100	100
1:4	80	80	80
1:8	80	66	66
1:16	66	0	66
Placebos	0	0	0

Tabla 2. Resultados de la prueba de potencia del preparado vacunal en hámsters. * El reto se realizó con 10.000 DL50 de cada serovar.

DISCUSION

Las vacunas conocidas hasta el momento como medida profiláctica contra la leptospirosis humana son suspensiones celulares mono, bi o

polivalentes, donde cada serovar está representado por concentraciones iguales o superiores a 100×10^6 células por serovar por dosis de vacuna. Además los esquemas de vacunación comprenden dos dosis con intervalo entre ellas de 7 a 21 días ^{8,9,17,18}. La utilización de vacunas de células completas frente a algunos patógenos puede potenciar la respuesta inmune, ya que incluyen en sí mismas componentes de membrana altamente inmunogénicos. Sin embargo las vacunas actuales confieren una inmunidad relativamente corta, de seis meses a un año ⁵⁻⁹.

Nuestra preparación vacunal está formada también por células completas de tres serogrupos de *Leptospira* (*L.canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*) y en ella se utiliza el gel de hidróxido de aluminio (Alhydrogel®) como adyuvante. Dado que la incorporación del adyu-

vante potencializa la respuesta inmune ^{19,20}, la carga antigénica se redujo a 50-80.10⁶ células por serovar por dosis del preparado vacunal con el objetivo de disminuir la reactogenicidad de la misma. Los estudios de inmunogenicidad y potencia de nuestra formulación adyuvada desarrollados en ensayos anteriores en hámsters demostraron que con la aplicación de dos dosis se logra una inmunidad más duradera. Por otro lado, sobre la base de los resultados obtenidos en la determinación de la dinámica de anticuerpos ¹² se definió que el tiempo óptimo para una segunda inmunización fue de seis semanas después de aplicada una primera dosis. De tal forma estos ensayos preclínicos se realizaron con el esquema de vacunación de dos dosis de 0,5 mL con intervalo de 6 semanas entre ellas.

Los diferentes esquemas de inmunización fueron evaluados sobre la base de los niveles de anticuerpos IgG obtenidos 15 días y al mes de la aplicación de la segunda dosis, así como los niveles totales de IgG. Estos fueron considerados como criterios indicativos de la magnitud de la respuesta humoral inducida. Escogimos como tiempo de evaluación 15 días después de la segunda dosis, basándonos en el principio de que la aplicación de una dosis de reestimulación permite al sistema inmunitario desarrollar una respuesta mucho más potente, rápida y efectiva ²¹, que en nuestro caso se alcanza a este tiempo, según estudios realizados en el laboratorio ¹². Por otro lado se compararon los niveles de anticuerpos 1 mes posterior a la segunda dosis ya que esto nos daba una idea de si los mismos se mantenían elevados. Además de hacerse una comparación en cuanto a cantidad de anticuerpos IgG inducidos en la respuesta, parámetro este que fue calculado como el área bajo la curva de la dinámica de anticuerpos.

Haciendo una comparación entre los esquemas evaluados observamos que con la dosis de 0,5 mL se obtienen los mejores resultados para los tres criterios analizados, con los intervalos entre dosis de 4 y 6 semanas, siendo la magnitud de la respuesta superior para el intervalo de 6 semanas entre dosis. Consideramos lógico este resultado ya que cuatro semanas después a la

primera dosis los niveles de anticuerpos circulantes todavía son elevados, por lo que una segunda inmunización provocaría la neutralización de los mismos ²¹.

Con el intervalo de 8 semanas los mejores resultados se obtienen con la dosis de 0,75 mL para los tres criterios evaluados. No es contradictorio que la dosis de 0,75 mL sea la más adecuada cuando se utiliza el intervalo de 8 semanas, ya que al ser el tiempo de separación entre las dosis mayor se necesita una mayor concentración de antígeno para activar todo el mecanismo de respuesta. Esto puede tener su explicación en el hecho de que el número de células antígeno-específicas circulantes sea menor con respecto a las 6 semanas ²¹. No obstante, la magnitud de la respuesta que se logra con el esquema de dosis de 0,75 mL e intervalo de 8 semanas es inferior a la obtenida con la dosis de 0,5 mL e intervalo de 6 semanas. Además con la dosis de 0,5 mL se confiere un nivel de protección del 100 % en los animales inmunizados. Por todo lo expuesto anteriormente consideramos que el mejor esquema de vacunación resultó ser el de dos dosis de 0,5 mL e intervalo de 6 semanas ($t > 2.12$).

El estudio de Dosis-Respuesta evidenció que aunque con la dosis de 0,25 no se logra una respuesta igual a la de 0,5 mL, la obtenida (Tabla 2) es suficiente para el establecimiento de un estado inmune capaz de neutralizar la acción de 10.000 DL50 de cepas altamente virulentas de *Leptospira*. Con esto se cumplen los requisitos de los controles de calidad para la prueba de potencia de estas vacunas, donde se plantea que esta prueba es satisfactoria cuando hay 100-80 % de supervivencia en los animales vacunados con relación a un 100-80 % de mortalidad en los animales controles ¹⁴.

Estos resultados avalan la utilización de las dosis de 0,25 y 0,5 mL en los ensayos clínicos de Fase II del preparado vacunal, en los cuales se estudiará la inmunogenicidad en humanos. Haber demostrado que dosis inferiores a 0,5 mL resultan inmunogénicas y protectoras nos permite proponerlas para su inclusión en el Protocolo de vacunación en humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ribeiro, M.A, C.C. Souza & S.H.P. Almeida (1995) *J. Trop. Med. Hyg.* 98: 452-6
2. Faine S. (1982) *Guidelines for the control of Leptospirosis*. WHO offset. publication N° 67. Geneva
3. Bolin C.A., J.A. Cassell, R.L. Zuerner & G. Trueba (1991) *Am. J. Vet. Res.* 52: 1639-43
4. Jost, B.H., B. Adler & S. Faine (1989) *J. Med. Microbiol.* 29: 115-20
5. Mazusawa, T, R. Suzuki & Y. Yanagihara (1991) *Microbiol. Immunol.* 35: 119-208

6. Midwinter, A., S. Faine & B. Adler (1990) *J. Med. Microbiol.* **33**: 199-204
7. Russel, F.B. & C.J. Russel (1982) *Am. J. Vet. Res.* **43**: 1109-13
8. Russel, F.B. and C.J. Russel (1986) *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* **2**: 175-97
9. WHO (1993) *Report of Discussions of the WHO working group on leptospirosis vaccine development and vaccinology. Minimum Requirements of Weil's Disease and Akiyami Combined Vaccine.* ANNEX II 9-13. Nagoya, Japan, 26-27 March. 1993
10. Cruz, R.P., P.H. Rodríguez, C.A. López, E.C. Atienzar, J.U. Abreus & F.A. Aldana (1986) *Rev. Cub. Hig. Epid.* **24**: 407-12
11. Oliva, R., J.F. Infante, M. González, V. Pérez, S. Sifontes, O. Marrero, Y. Valdés, M. Fariñas, L. Estévez & I. González (1994) *Arch. Med. Res.* **25**: 165-70
12. Documento de Solicitud de Ensayo Clínico al CEDMED (1994) Instituto Finlay, Mayo 1994
13. Ellinghausen, H.C., W.G. Mc.Cullough (1965) *Am. J. Vet. Res.* **26**: 45-51
14. Comisión Científica permanente sobre Leptospirosis (1994) *Manual de Leptospirosis.* Impresiones Avellaneda S.A. Buenos Aires. Octubre 1994
15. Reed, L.J. & H. Muench (1938) *Am. J. Hyg.* **27**: 493-7
16. López, P.R. (1988) *Diseño estadístico de experimentos.* Editorial Científico-Técnica. La Habana, pág. 203
17. Ting-zuo, C. (1986) *Ann. Immunol Hung.* **26**: 125-51
18. Shenberg, E.T. (1973) *J. Infect. Dis.* **128**: 642-6
19. Grupo Científico de la OMS sobre Coadyuvantes Inmunológicos (1975) Ginebra, 6-10 de Octubre de 1975. ISBN 92 4 320595 1, págs. 7-12
20. Rajesh, K.G. & R.S. George (1995) *Vaccine* **13**: 1263-76
21. Roit, I. (1993) *Inmunología.* Ediciones Científicas y Técnicas, 3ra Edición. Barcelona, España