

**Instituto Finlay**



**República de Cuba**

# **EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE CEPAS AUTÓCTONAS DE LEPTOSPIRA INTERROGANS ...**

Mariela Margarita Naranjo Medina

**Tesis (Doctor en Ciencias de la Salud)**

**La Habana, 2010**

610-Nar-E

Naranjo Medina, Mariela Margarita.

Evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum como candidato vacunal contra la Leptospirosis / Mariela Margarita Naranjo Medina, Gustavo Sierra González, tutor; – La Habana : Editorial Universitaria, 2012. -- ISBN 978-959-16-1688-3. – 165 pág.

1. Sierra González, Gustavo, tutor.
2. Instituto Finlay.
3. Tesis (Doctor en Ciencias de la Salud).



Mariela Margarita Naranjo Medina, 2012.



**La Editorial Universitaria** (Cuba) publica bajo licencia *Creative Commons* de tipo Reconocimiento, Sin Obra Derivada, se permite su copia y distribución por cualquier medio siempre que mantenga el reconocimiento de sus autores y no realice ninguna modificación.

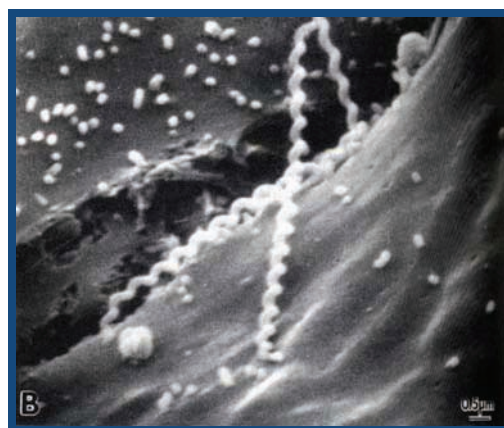
Calle 23 entre F y G, No. 564. El Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400, Cuba

e-mail: [torri@reduniv.edu.cu](mailto:torri@reduniv.edu.cu)

Sitio Web: <http://revistas.mes.edu.cu>

**Instituto Finlay  
Vicepresidencia de Investigaciones**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS Y PRECLINICAS  
"VICTORIA DE GIRON"**



**“Evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum como candidato vacunal contra la leptospirosis”**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud  
Especialidad Inmunología**

**Autor: Lic. Mariela Margarita Naranjo Medina, MSc**

**Instituto Finlay  
Vicepresidencia de Investigaciones**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS Y PRECLINICAS  
“VICTORIA DE GIRON”**

**Evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum como candidato vacunal contra la leptospirosis**

**Tesis presentada en opción al grado científico de**

**Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. Mariela Margarita Naranjo Medina, MSc**

**Tutor: Dr. Gustavo Sierra González, DrCM**

**Ciudad de La Habana**

**2010**

## AGRADECIMIENTOS

*Muchos han sido los que de una forma u otra han contribuido a mi formación y a la realización de este trabajo; a todos, mi más sincero agradecimiento. Quisiera agradecer de modo especial a quienes han sido mis más cercanos colaboradores.*

*En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Gustavo Sierra González quien acepto ser mi tutor, por sus experimentados consejos, por su confianza y ayuda en todo momento.*

*A Níurka y a Kirenia por su ayuda incondicional en todos los trabajos realizados. A Yolanda Valdés por su cooperación.*

*A Isabel Martínez, por sus experimentados consejos y revisión crítica de este manuscrito.*

*A Maricela Pichardo, María de Jesús y Maribel Cuelló por su ayuda incondicional.*

*A la vicepresidencia de investigaciones y en especial a Rosa Lidia Solís por su confianza y apoyo en el momento justo.*

*A María Cristina Linares por su valiosa ayuda y ante todo por ser mi amiga.*

*A Alina Batista por su constante cooperación y apoyo de manera desinteresada. Por su amor.*

*A mis padres por haber sabido guiarme por el camino correcto y por su amor.*

*A mis compañeros de trabajo por apoyarme en esta contienda.*

*A la Revolución, sin la cual no sería posible este empeño.*

## **DEDICATORIA**

*A mis padres por contribuir con su ejemplo  
y dedicación infinita a mi formación.*

*A la Revolución.*

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

ACC-.	Academia de Ciencias de Cuba
AcM-.	Anticuerpos monoclonales
ADN-.	Ácido desoxirribonucleico
BSA-.	Albúmina sérica bovina
B <sub>1</sub> -.	Vitamina B <sub>1</sub>
B <sub>12</sub> -.	Vitamina B <sub>12</sub>
BPL-.	Buenas Prácticas de Laboratorio
CENPALAB-.	Centro para Producción de Animales de Laboratorios
CECMED-.	Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos
CPHE-.	Centro Provincial de Higiene y Epidemiología.
DL <sub>50</sub> -.	Dosis letal media
ELISA-.	Ensayo inmunoenzimático
EMJH-.	Medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris ó Tweem-albúmina
IgM-.	Inmunoglobulina M
IgG-.	Inmunoglobulina G
IM-.	Intramuscular
INHEM-.	Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología
IP-.	Intraperitoneal
LCR-.	Líquido cefalorraquídeo
Lig A-.	Lipoproteína A similar a inmunoglobulina
Lig B-.	Lipoproteína B similar a inmunoglobulina
LPS-.	Lipopolisacárido
MAT-.	Técnica de microaglutinación
MINSAP-.	Ministerio de Salud Pública
OMS-.	Organización Mundial de la Salud
OPS-.	Organización Panamericana de la Salud
PCR-.	Reacción en cadena de la polimerasa
PME-.	Proteínas de membrana externa
PNO-.	Procedimientos Normalizados de Operación
rRNA-.	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS-.	Dodecilsulfato de Sodio
SDS-PAGE-.	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SNC-.	Sistema Nervioso Central
SphH-.	Esfingomielinasa H
SphA-.	Esfingomielinasa A
T2SS-.	Sistema de secreción tipo 2
TFS-.	Tampón fosfato salino

## SÍNTESIS

---

A partir de los aislamientos del agente causal de 53 casos clínicos autóctonos de *Leptospira* fueron seleccionadas y caracterizadas microbiológica e inmunológicamente dos cepas con características requeridas para ser consideradas candidatas vacunales del serogrupo Ballum, el cual no está presente en la formulación registrada de la vacuna cubana antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL<sup>®</sup>. En este trabajo se evaluó la potencialidad vacunal de dos cepas de *Leptospira interrogans* del serogrupo con mayor circulación en humanos en Cuba. Se formularon preparaciones vacunales monovalentes a partir de cada cepa y se evaluó, mediante microaglutinación y ELISA, la inmunogenicidad en hámsteres. Además, se evaluó la capacidad de protección homóloga y heteróloga de ambas preparaciones, frente al reto con aproximadamente 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de cinco cepas altamente virulentas de los serogrupos Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Por último, se evaluó el efecto de una dosis única de vacuna monovalente de Ballum en animales previamente inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, tras seis semanas de completado el esquema de inmunización de la vacuna trivalente, la protección pasiva conferida por el suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> frente a estas cepas, la protección cruzada con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, así como se determinó cual de los serogrupos componentes de la vacuna cubana era el responsable de esta protección cruzada. Ambas cepas seleccionadas mostraron una alta virulencia y patogenicidad en el modelo Hámster Sirio, una buena estabilidad en los cultivos y un nivel de comunidad antigénica con las cepas de los serogrupos Canicola, Ictero y Pomona que permite su refuerzo antigénico mutuo. La vacuna antileptospirósica, vax-SPIRAL<sup>®</sup>, confirió también en el modelo animal usado en el presente trabajo, una significativa protección con una, dos dosis y varias diluciones de la vacuna frente al reto con las cepas de Ballum, sin embargo el suero proveniente de hámsteres y humanos inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, respectivamente, fue capaz de conferir una alta protección en los animales, mientras que la dilución 1/2 confirió sólo una protección parcial. La protección conferida por la formulación de vax-SPIRAL<sup>®</sup>, es parcial en la experiencia clínica y también en nuestro modelo lo cual corrobora la necesidad de Ballum en la protección activa. Se evidenció que la protección cruzada conferida por vax-SPIRAL<sup>®</sup> frente al serogrupo Ballum, es debida fundamentalmente al serogrupo Canicola y en menor cuantía al serogrupo Ictero. Lo cual puede tener interés al decidir formulaciones vacunales en el futuro. El suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> y el de los animales inmunizados reconocieron antígenos importantes de la membrana de *Leptospira* como las proteínas de 32, 41, 45, 48 kDa y las proteínas flagelares de 35-36 kDa. Lo cual aporta marcadores de seguimiento de la consistencia vacunal y para desarrollos futuros. El presente trabajo, por primera vez, sienta las bases para formulaciones vacunales novedosas conteniendo el serogrupo Ballum.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>I-. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
I.1-. Problema de investigación.....	11
I.2-. Hipótesis.....	11
I.3-. Objetivo general.....	11
I.4-. Objetivos específicos.....	11
I.5-. Novedad científica.....	12
I.6-. El valor científico.....	13
I.7-. Importancia práctica, social y económica.....	13
<b>II-. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
II.1-. Aspectos históricos.....	15
II.2-. Taxonomía y clasificación.....	16
II.3-. Biología de las leptospiros.....	17
II.4-. Patogenia.....	19
II.5-. Manifestaciones clínicas.....	23
II.6-. Diagnóstico.....	25
II.7-. Epidemiología.....	27
II.8-. Modelos animales utilizados para estudiar la leptospirosis.....	33
II.9-. Inmunidad.....	33
II.10-. Inmunización y vacunas.....	37
II.11-. <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum: situación actual.....	41
<b>III-. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
III.a-. Materiales y métodos generales.....	46
III.a.1-. Animales de experimentación.....	46
III.a.2-. Observación clínica y estudios anatomopatológicos.....	47
III.a.3-. Prevalencia de <i>Leptospira</i> en los órganos.....	47
III.a.4-. Vacuna empleada.....	47
III.a.5-. Inmunización.....	48
III.a.6-. Toma de muestras de sangre de los animales inmunizados.....	48
III.a.7-. Retos.....	48
III.a.8-. Cepas bacterianas.....	48
III.a.9-. Análisis estadístico.....	49
III.1-. Selección de las cepas candidatas vacunales.....	50
III.1.1-. Clasificación serológica.....	50
III.1.2-. Evaluación cualitativa de la virulencia.....	51
III.1.3-. Cinética del crecimiento de las cepas seleccionadas.....	51
III.1.4-. Evaluación de la patogenia de la enfermedad en hámsteres.....	52
III.1.5-. Determinación de la dosis letal media.....	52
III.1.6-. Identificación de los perfiles antigénicos celulares y extracelulares.....	53
III.2-. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga y heteróloga de preparados vacunales monovalentes del serogrupo Ballum.....	54
III.3-. Evaluación del efecto de una inmunización con una dosis de <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL®.....	56
III.4-. Evaluación de la inmunidad cruzada en los hámsteres vacunados con vax-SPIRAL®.....	56
III.5-. Inmunización pasiva.....	57
III.6-. Identificación de los serogrupos componentes de vax-SPIRAL® que confieren protección	

cruzada a <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum.....	58
III.7-. Identificación de los antígenos de <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum por el suero de hámster y humanos vacunados con vax-SPIRAL® .....	59
<b>IV-.RESULTADOS</b> .....	60
IV.1-. Selección de las cepas candidatas vacunales.....	60
IV.1.1-. Clasificación serológica.....	60
IV.1.2-. Evaluación cualitativa de la virulencia.....	60
IV.1.3-. Cinética del crecimiento de las cepas seleccionadas.....	63
IV.1.4-. Evaluación de la patogenia de la enfermedad en hámsteres.....	67
IV.1.5-. Determinación de la dosis letal media.....	75
IV.1.6-. Identificación de los perfiles antigénicos celulares y extracelulares.....	75
IV.2-. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga y heteróloga de preparados vacunales monovalentes del serogrupo Ballum.....	78
IV.3-. Evaluación del efecto de una inmunización con una dosis de <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL® .....	82
IV.4-. Evaluación de la inmunidad cruzada en los hámsteres vacunados con vax-SPIRAL® ...	86
IV.5-. Inmunización pasiva.....	88
IV.6-. Identificación de los serogrupos componentes de vax-SPIRAL® que confieren protección cruzada a <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum.....	91
IV.7-. Identificación de los antígenos de <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum por el suero de hámster y humanos vacunados con vax-SPIRAL® .....	94
<b>V-. DISCUSIÓN</b> .....	97
V.1-. Selección de las cepas candidatas vacunales.....	97
V.1.3-. Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas.....	99
V.1.4-. Evaluación de la patogenia de la enfermedad en hámsteres.....	101
V.1.5-. Determinación de la dosis letal media.....	102
V.1.6-. Identificación de los antígenos proteicos celulares y extracelulares.....	102
V.2-. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga y heteróloga de preparados vacunales monovalentes del serogrupo Ballum.....	109
V.3-. Evaluación del efecto de una inmunización con una dosis de <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL® .....	113
V.4-. Evaluación de la inmunidad cruzada en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL® .....	115
V.5-. Inmunización pasiva.....	115
V.6-. Identificación de los serogrupos componentes de vax-SPIRAL® que confieren protección cruzada a <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum.....	117
V.7-. Identificación de los antígenos de <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Ballum por el suero de hámster y humanos vacunados con vax-SPIRAL® .....	118
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	119
<b>VI-.CONCLUSIONES</b> .....	122
<b>VII-. RECOMENDACIONES</b> .....	123
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	124
<b>ANEXOS</b> .....	149

## I. INTRODUCCIÓN

---

La leptospirosis, entidad clínica infecciosa conocida también como enfermedad de Weil, enfermedad de los arrozales o del ratón, es una de las zoonosis bacterianas más difundidas en el mundo. Además, debido a las afecciones que produce en el hombre y los animales, así como por su repercusión económica en los países pobres y ricos, constituye una enfermedad de extraordinaria importancia para la medicina humana y la veterinaria (Levett P, 2001; McBride A y cols., 2005; WHO, 2009). Esta enfermedad es causada por una espiroqueta perteneciente a la especie fenotípica *Leptospira interrogans*, bacteria delgada y helicoidal, con una activa motilidad. Las leptospiras se clasifican en 12 especies patógenas y cuatro saprofitas, con más de 250 serovares patógenos (Brenner D y cols., 1999; Faine S y cols., 1999; Alfaro C, 2004), cuyo tipaje serológico se basa en la estructura antigénica del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (Bulach D y cols., 2000).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera a la leptospirosis como una de las zoonosis desatendidas de las poblaciones relegadas (OPS, 2005; 2009), grupos donde hasta un 20% del total de los casos notificados evolucionan a estadios clínicos graves (WHO, 2009). Sin embargo, la carga de la enfermedad se subestima por ser significativamente pobre la calidad de los datos en la vigilancia, así como por las dificultades del diagnóstico (McBride A y cols., 2005). Todo lo expuesto anteriormente, unido a las graves pérdidas económicas y humanas ocasionadas por esta enfermedad, justifica el uso de vacunas profilácticas en las poblaciones humanas y animales con un elevado riesgo de enfermar. La inmunidad contra la leptospirosis es principalmente del tipo humoral, pero debido a la inmunodominancia del LPS, es también serogrupo y serovar específica. Por ese motivo las vacunas disponibles en la actualidad, productos biofarmacéuticos constituidos por células enteras de leptospiras inactivadas, con o sin adyuvante, deben incluir en sus formulaciones a los serovares de mayor circulación en la región seleccionada para su aplicación (Levett P, 2001; WHO, 2003a). Sin embargo, en los últimos años se describe también una protección cruzada entre los diferentes serogrupos y serovares (Sonier C y cols., 2000; Branger C y cols., 2001; González A, 2003b).

Las vacunas para los seres humanos y animales se han utilizado desde el año 1920, casi todas han sido desarrolladas a partir de células de *Leptospira* inactivadas por métodos físicos y químicos (Faine S y cols., 1999). Estas vacunas, compuestas de células inactivadas de los serovares prevalecientes en una determinada región geográfica, están disponibles en algunos países, pero tienen entre sus desventajas el que ocasionan algunos eventos adversos y confieren una protección de corta duración. Además, no pueden proporcionar protección cruzada contra la infección por los más de 250 serovares de *Leptospira* descritos (Haake D y cols., 2000; McBride A y cols., 2005). Evaluaciones de otros tipos de vacunas se han realizado en varios biomodelos experimentales con diversos grados de éxito. Pero aún siguen siendo las bacterinas (Wang Z y cols., 2007) las que han protegido considerablemente contra la infección letal en las especies estudiadas (Ko A y cols., 1999; Moore G y cols., 2006)

Una vacuna trivalente antileptospirósica para uso humano conformada por tres serogrupos: Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona (Martínez R y cols., 1993; González M y cols., 1997), fue desarrollada en Cuba por el Instituto Finlay, a finales de la década de los años 80 y principios de los 90, debido a la grave situación epidemiológica de la leptospirosis existente en el país y a la no-disponibilidad de una vacuna soviética que se importaba. Este producto, registrado en 1998 bajo el nombre comercial vax-SPIRAL<sup>®</sup> (Instituto Finlay, 1998), se aplica a los principales grupos de riesgo, medida que logra controlar y disminuir la morbilidad de la leptospirosis humana, con una elevada efectividad (Bedevia A, 1999; Martínez R y cols., 2000; González M y cols., 2004). Sin embargo, en los últimos años la situación inmunoepidemiológica de la leptospirosis ha variado en Cuba y entre los años 1996 al 2000, el serogrupo Ballum constituyó el principal agente etiológico de más del 55% de los aislamientos obtenidos en todo el país a partir de muestras obtenidas en pacientes con evidencias clínicas, serológicas y epidemiológicas de leptospirosis (Rodríguez I y cols., 2002; 2009; Obregón A y cols., 2007). La actual situación epidemiológica demuestra la necesidad de desarrollar estrategias para producir nuevas formulaciones de vacunas antileptospirósicas como una medida profiláctica eficaz que se ajuste a las nuevas condiciones existentes.

Previo a la inclusión del serogrupo Ballum en una formulación vacunal para uso humano, es imprescindible hacer una adecuada selección y caracterización microbiológica de las posibles cepas a utilizar como candidatas vacunales. Además, se deben realizar investigaciones básicas en modelos animales que comprueben la capacidad inmunoprotectora de las formulaciones obtenidas a partir de los nuevos inmunógenos entre otros ensayos preclínicos y clínicos.

### **I.1. Problema de investigación**

Debido a la alta incidencia del serogrupo Ballum en el país, ¿será posible contar con cepas de este serogrupo bien caracterizadas microbiológica e inmunológicamente como candidatos vacunales?

### **I.2. Hipótesis**

La selección de cepas autóctonas del serogrupo Ballum, aisladas de casos clínicos con leptospirosis, por su elevada virulencia, patogenicidad, estabilidad en los medios de cultivo y conservación, así como por su perfil de inmunogenicidad homóloga y heteróloga, nos permitirá contar con cepas que reúnan los requisitos de protectogenicidad y puedan ser utilizadas como candidato vacunal en una vacuna antileptospirosis.

### **I.3. Objetivo general**

Contribuir a la evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas del serogrupo Ballum para ser utilizadas como candidato en una vacuna antileptospirosis.

### **I.4. Objetivos específicos**

1. Seleccionar y caracterizar, sobre la base de la virulencia, patogenicidad, crecimiento en cultivo y perfil antigénico celular y extracelular, cepas clínicas autóctonas del serogrupo Ballum.
2. Evaluar la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga y heteróloga de preparados vacunales monovalentes elaborados con estas cepas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en el Hámster Sirio.

3. Evaluar el efecto de una inmunización con estos preparados de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, como búster o reactivación.
4. Evaluar la inmunidad cruzada en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, frente al reto heterólogo con cepas virulentas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum.
5. Evaluar la protección conferida por el suero de hámsteres y humanos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> y el suero de hámsteres inmunizados con los preparados monovalentes del serogrupo Ballum, en el biomodelo Hámster Sirio frente a cepas virulentas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum.
6. Identificar los serogrupos componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup> que confieren protección cruzada contra el serogrupo Ballum.
7. Inmuno-identificar antígenos de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum mediante reconocimiento por el suero de hámster y humanos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>.

### 1.5. Novedad científica

El presente trabajo comprende la primera descripción hecha en Cuba sobre la evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas del serogrupo Ballum, aisladas de casos clínicos con evidencias serológicas, clínicas y epidemiológicas de leptospirosis y la primera de estas caracterizaciones de cepas del serogrupo Ballum realizadas con fines vacunales a nivel mundial. Debido al ascenso de la incidencia de este serogrupo y sus serovares en el país, y la comprobación de que también es prevalente en otros países y regiones, se evaluó su posible inclusión dentro de una vacuna antileptospirósica para uso humano. El presente trabajo concluyó, exitosamente, la primera etapa de ese objetivo, analizando la protección cruzada obtenida con una vacuna experimental de este serogrupo de manera global y contra cada uno de los serogrupos componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup>, por separado, y el efecto que produce una dosis de refuerzo con el serogrupo Ballum sobre los hámsteres inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>. El potencial vacunal de las cepas aisladas y caracterizadas se pudo corroborar mediante la protección contra el reto con cepas homólogas y heterólogas y se calificó como excelente. En uno de los bloques experimentales se evidenció, mediante electroforesis en SDS-PAGE, y **western blotting** una elevada asociación del serogrupo Ballum con los serogrupos componentes de vax-

SPIRAL<sup>®</sup>, lo que pudiera constituir una explicación para el mutuo refuerzo protectogénico observado, también se demostró cuál de los serogrupos incluidos en vax-SPIRAL<sup>®</sup> contribuyó más a la protección cruzada contra Ballum y cuál es la contribución de Ballum en la protección contra los restantes serogrupos, resultado que también se obtuvo por primera vez en el presente trabajo.

En este estudio se evidenció que los aislamientos obtenidos del serogrupo Ballum fueron estables en cuanto a su viabilidad, virulencia y dosis letal media, durante varios subcultivos en condiciones controladas de laboratorio. Además, las cepas mostraron ser inmunogénicas y protectoras en el biomodelo animal, lo cual unido a su estabilidad en los medios de conservación y el mantenimiento de sus características antigénicas, luego de sucesivos pases por animales, avaló su posible inclusión en las formulaciones vacunales para la prevención de la leptospirosis. Este trabajo está respaldado por publicaciones nacionales e internacionales y ha recibido Premios Nacionales de la Academia de Ciencias de Cuba (ACC) y del Fórum de Ciencia y Técnica.

#### **I.6. El valor científico**

Radica en el aporte de nuevas evidencias relacionadas con el aislamiento de cepas autóctonas de *Leptospira* serogrupo Ballum y su caracterización como cepas candidatas vacunales para su posible utilización en otras vacunas antileptospirósicas. La posibilidad de su empleo como dosis de refuerzo, que potencialmente refuercen los niveles de protección hacia los componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup> y hacia el propio serogrupo Ballum no incluido en esta formulación, así como la protección cruzada con la vacuna cubana.

#### **I.7. Importancia práctica, social y económica**

Está dada por las futuras aplicaciones de estas cepas en nuevas formulaciones vacunales contra la leptospirosis, con el objetivo de prevenir la enfermedad causada por este serogrupo que muestra, en estos momentos, una alta incidencia en Cuba, lo cual contribuirá a disminuir los daños económicos causados y, por consiguiente, ayudará en la solución de un problema de salud importante, no sólo en las poblaciones de riesgo, sino en toda la población en general.

La tesis está estructurada en 7 capítulos: Introducción (6 páginas); Revisión Bibliográfica (30 páginas); Materiales y Métodos (14 páginas); Resultados (19 páginas); Discusión (25 páginas); Conclusiones (1 página) y Recomendaciones (1 página). Se incluyen también, una Tabla de Contenido, una lista de Abreviaturas y Acrónimos, una Síntesis del trabajo y Anexos. Además, se presentan las Referencias Bibliográficas consultadas (275 citas).

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### II.1. Aspectos históricos

La leptospirosis es una zoonosis de amplia distribución mundial, causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. El espectro clínico de la enfermedad en los humanos es muy amplio y abarca desde una infección subclínica hasta un síndrome severo de infección multiórgano, con una elevada mortalidad. Este síndrome, leptospirosis icterica con fallo renal, se describe inicialmente hace más de 100 años (1886), por Adolfo Weil, en Heidelberg (Weil A, 1886). Sin embargo, varios años antes de esa descripción se señala un síndrome idéntico en trabajadores del alcantarillado (Landouzy L, 1883a; 1883b).

La leptospirosis se reconoce como un riesgo ocupacional de los cultivadores de arroz en la antigua China y en Japón se le denomina “akiyami” o la fiebre de otoño. Está bien documentado que existen descripciones precisas de esta enfermedad a partir del siglo XIX, algunos años antes de la notificación hecha por Weil (Faine S, 1994).

Sitmsom demuestra, mediante una tinción con plata, la presencia de un conglomerado de leptospiras en un corte histológico de riñón obtenido de un paciente fallecido durante una epidemia de fiebre amarilla. Las espiroquetas mostraban extremos encorvados, motivo por el cual Sitmsom las denomina “Spiroquetas interrogans” debido a su semejanza con el signo de interrogación. Sin embargo, esta importante observación se desecha durante muchos años (Faine S, 1994).

La etiología de la leptospirosis se demuestra de forma independiente en 1915 por Japón y Alemania (Everard J, 1996). En Japón, Inada e Ido detectan la presencia de leptospiras, así como anticuerpos específicos contra ellas, en la sangre de mineros con el síndrome infeccioso. Paralelamente, también la describen, dos grupos de médicos alemanes al estudiar soldados alemanes afectados por la “enfermedad francesa” en las trincheras del noreste de Francia. Además, Uhlenhuth y Fromme (Uhlenhuth P y Fromme W, 1915) y Hubener y Reiter (Hubener E y Reiter H, 1915) señalan la presencia de espiroquetas en la sangre de curieles inoculados con la sangre obtenida de soldados infectados. La

confirmación de la ocurrencia de leptospirosis en ambos lados del frente occidental se logra después de la publicación en Europa del trabajo de Inada (Adler B, De la Peña M, 2009).

## **II.2. Taxonomía y clasificación**

Las especies de *Leptospira* se ubican en el orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y en el género *Leptospira*. Este género comprende dos especies fenotípicas: *L. interrogans*, que agrupa a leptospiros patógenas, agente causal de la leptospirosis en el hombre y los animales y *L. biflexa*, que incluye las saprofitas de vida libre, microorganismos que se encuentran fundamentalmente en las aguas superficiales y de forma muy ocasional en aguas marinas (Cachay E y Vinetz J, 2005). A diferencia de *L. interrogans*, las cepas de *L. biflexa* no se asocian con infecciones en los humanos o animales, y son avirulentas en los animales de laboratorio (Cachay E y Vinetz J, 2005).

Por debajo del nivel de especie, tanto *L. interrogans* como *L. biflexa*, se clasifican en serogrupos y serovares, atendiendo a sus características serológicas (Levett P, 2001). Se han identificado alrededor de 80 serovares de *L. interrogans* (Brenner D y cols., 1999). Los serogrupos contienen los serovares antigénicamente relacionados y se conocen 24 serogrupos para las cepas patógenas. La lista de los serovares se actualiza periódicamente, y recientemente se han descrito dos nuevos serovares patógenos (Corney B y cols., 2008; Valverde M y cols., 2008). La identificación de los serovares es esencial para el entendimiento de la epidemiología de esta enfermedad. Los serogrupos identificados utilizando la prueba de microaglutinación (MAT), no tienen un reconocimiento taxonómico oficial, pero sirve para agrupar los serovares con antígenos comunes.

La clasificación, el tipaje y la caracterización de las cepas mediante anticuerpos monoclonales (AcM) y las técnicas de biología molecular, permiten un mayor conocimiento sobre las relaciones antigénicas y genómicas entre las cepas de *Leptospira*. El uso de AcM posibilita hacer de forma rápida, mediante microaglutinación, la identificación de las mismas hasta el nivel de serovar (Terpstra M y cols., 2000; Silva E y cols., 2009).

En la actualidad, además de la clasificación fenotípica, existe la tipificación genética, sin existir relación directa o correspondencia entre ambas (Levett P, 2001, Silva E y cols., 2009). La caracterización genética mediante la hibridización ADN-ADN permite la división del género en 20 especies genómicas diferentes o genomaespecies (Brenner D y cols., 1999; Levett P y cols., 2005b; 2006; International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008; Slack A y cols., 2008; 2009; Ko A y cols., 2009). Debido a la falta de correspondencia entre ambas clasificaciones (fenotípica y genética), existen especies genómicas que incluyen serovares patógenos y no patógenos, así como serovares incluidos en más de una especie genómica. De esta forma, la especie genómica es típica de la cepa y ningún serogrupo o serovar predice la especie genómica a la cual pertenecerá una cepa en cuestión (Levett P, 2001; Silva E y cols., 2008).

En la reunión del Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* del 2007, desarrollada en Quito, Ecuador, se decide dar el estatus de especies a las genomaespecies 1, 3, 4 y 5, (descritas previamente) y resultante en una familia que comprende 13 especies patógenas de *Leptospira*: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomaespecie 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomaespecie 3), *L. weilii*, *L. wolffii*, con más de 260 serovares. La especie saprofita de *Leptospira* incluye: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomaespecies 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomaespecies 4) y *L. wolbachii*, con más de 60 serovares (Sandow K y Ramírez W, 2005).

### **II.3. Biología de las leptospiros**

Las leptospiros son bacterias muy finas, de 6 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y 0,1 a 0,2  $\mu\text{m}$  de ancho, pero cultivos ocasionales pueden contener células más largas. Son flexibles, helicoidales, con las extremidades encorvadas en forma de gancho (Faine S y cols., 1999). Poseen dos filamentos axiales (flagelos periplasmáticos) con inserciones polares que se localizan en el espacio periplasmático (Swain R, 1957) y son las estructuras responsables de su motilidad; mientras que las proteínas FlaA y FlaB constituyen la vaina flagelar y el centro, respectivamente, aunque la microscopía electrónica muestra una mutante FlaB deficiente de endoflagelo y sin motilidad (Picardeau M y cols., 2001).

La estructura de las proteínas flagelares es compleja (Trueba G y cols., 1992). Las leptospiras son móviles y exhiben dos formas distintas de movimiento (traslación y rotación) (Berg H, 1978). Desde el punto de vista morfológico, todas las leptospiras son indistinguibles, aunque su morfología en aislamientos individuales varía con el subcultivo *in vitro* y puede restaurarse mediante el pase por hámsteres (Ellis W y cols., 1983). Las leptospiras tienen una estructura típica de doble membrana: la membrana citoplasmática y la pared celular del péptidoglicano, ambas asociadas y recubiertas por una membrana externa (Cullen P y cols., 2004). Dentro de la membrana externa, el LPS constituye su antígeno principal, sustancia con una estructura y propiedades antigénicas semejantes al LPS descrito en las bacterias gramnegativas. No obstante, es relativamente no toxigénico en las células o animales, siendo 12 veces menos letal para los ratones que el LPS de *Escherichia coli* (Faine S y cols., 1999) y es menos activo en las pruebas estándares para la actividad endotóxica, como la prueba de pirogenicidad en conejo, letalidad en ratón, reacción de Schwartzman y mitogenicidad de las células B (Werts C y cols., 2001; Que-Gewirth N y cols., 2004). El lípido A de las leptospiras contiene algunos rasgos inusuales (Que-Gewirth N y cols., 2004), que incluyen una unidad de disacárido de glucosamina modificada (fosforilada y metilada).

Además del LPS, proteínas estructurales y funcionales forman parte de la membrana externa de estos microorganismos. Tres clases de proteínas de membrana externa (PME) se han identificado: 1) las lipoproteínas, la clase más abundante, que comprende LipL32, LipL41, LipL48, LipL36 y LipL21 (Shang E y cols., 1996; Haake D y cols., 1998; 2000; Haake D y Matsunaga J, 2002; Cullen P y cols., 2003) y Qlp42 (Nally J y cols., 2001); 2) la proteína de transmembrana OmpL1 (Shang E y cols., 1995; Dong H y cols., 2008); 3) las proteínas periféricas como LipL45 (Matsunaga J y cols., 2002). También el sistema de secreción tipo dos (T2SS) que secreta GspD (Rodríguez-Reyes E y cols., 2005), se localiza en la membrana externa de las leptospiras y muestra sus propiedades antigénicas.

Las leptospiras son microorganismos aerobios obligados, con una temperatura óptima de crecimiento entre 28-30°C y capaces de producir catalasa y oxidasa. Crecen en medios

simples enriquecidos con vitaminas ( $B_1$  y  $B_{12}$ , factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio (Johnson R y Faine S, 1984). Los ácidos grasos de cadena larga, se utilizan como única fuente de carbono y son metabolizados por  $\beta$ -oxidación (Faine S y cols., 1999). Para su crecimiento, requieren medios que contengan suero o albúmina y entre los mismos, se encuentran los medios líquidos enriquecidos con suero de conejo: Fletcher, Korthoff, Noguchi y Stuart (Faine S y cols., 1999). Actualmente, el medio más utilizado es el Tween 80-albúmina, también conocido por las iniciales de sus autores Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), compuesto por ácido oleico, albúmina de suero bovino y polisorbato (Tween). Algunas cepas, para su aislamiento inicial, requieren la adición de piruvato o suero de conejo. El crecimiento de los contaminantes presentes en las muestras clínicas se inhibe con la adición al medio de: 5-fluorouracilo, gentamicina, ácido nalidíxico o rifampicina (Faine S y cols., 1999). El crecimiento de estos microorganismos es lento en el aislamiento primario, debiéndose mantener incubados durante aproximadamente 13 semanas antes de descartar un cultivo como negativo. A los medios se les puede agregar agar a bajas concentraciones (0,1-0,2%). En los medios semisólidos, el crecimiento de las leptospiros alcanza su máxima densidad en una zona discreta bajo la superficie del medio, zona que llega a ser intensamente turbia con los beneficios de la incubación. Este crecimiento se relaciona con la tensión óptima de oxígeno y se le denomina “anillo o disco Dinger”. Los cultivos de las leptospiros se mantienen mediante subcultivos repetitivos o almacenados en agar semisólido con hemoglobina. El almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido también rinde buenos resultados y es el método de elección para mantener la virulencia de estos microorganismos. Las leptospiros pueden sobrevivir largo tiempo en el agua o ambientes húmedos, templados y con un pH neutro o ligeramente alcalino.

#### **II.4. Patogenia**

Las leptospiros penetran en el hombre a través de la piel erosionada o las mucosas sanas y de la piel intacta después de una inmersión prolongada en agua (Adler B y cols., 2009). Después de entrar al organismo, difunden con rapidez y transcurridas las primeras 48 h pueden alcanzar todos los humores y tejidos, con una localización especial en el riñón, el hígado, el corazón y los músculos esqueléticos. Estos microorganismos son resistentes a la

actividad bactericida del suero normal y en ausencia de anticuerpos específicos no son fagocitados ni destruidos por los polimorfonucleares o macrófagos (Levett P, 2001). Entre los primeros cinco a siete días de la infección, los anticuerpos específicos formados favorecen la opsonización del microorganismo, éste deja de circular en la sangre y se eliminan por la orina durante semanas o meses.

La leptospirosis puede considerarse una enfermedad generalizada y sistémica, entidad que se traduce principalmente como una vasculitis infecciosa donde predomina la lesión vascular de tipo capilar, daño responsable del edema y la diátesis hemorrágica, que afecta fundamentalmente a los capilares del hígado, del pulmón y el riñón (Levett P, 2001).

El gran daño celular, en presencia de pocos microorganismos, sugiere la mediación de factores tóxicos de la espiroqueta y del huésped. Además, la pobreza de alteraciones patológicas en determinados órganos, a pesar de los profundos disturbios funcionales, hace pensar que muchos de los aspectos de la enfermedad son ocasionados por productos tóxicos liberados por el germen. Durante la fase aguda, la migración de bacterias, toxinas, enzimas o productos antigénicos liberados a través de la lisis bacteriana conducen a una permeabilidad vascular aumentada, manifestación más precoz y constante de la enfermedad. Las lesiones celulares de los diversos órganos tienen como base patogénica estos mismos factores que actúan inicialmente sobre la membrana celular, adicionada a una eventual hipoxemia derivada del daño vascular (Silva E y cols., 2008).

La respuesta inmune está implicada en la patogénesis de la leptospirosis como; la formación de inmunocomplejos, la liberación de citoquinas y la vasculitis autoinmune (Cinco M y cols., 2006). Así, los signos y síntomas del compromiso pulmonar, renal y hepático, aparecen en la fase inmune cuando las aglutininas específicas comienzan a detectarse. Por otro lado, los resultados de investigaciones clínicas realizadas en Brasil sugieren que la gravedad de la leptospirosis podría relacionarse con la intensidad de la respuesta inmune. La trombocitopenia se atribuye también a ese mecanismo (Malajov Y y cols., 2007).

Las leptospiras virulentas son resistentes al complemento y a la muerte por los neutrófilos del huésped no-inmune, pero son rápidamente eliminadas en presencia de anticuerpos específicos. No existe evidencia de una toxina clásica secretada por las leptospiras; de hecho, en los riñones de curieles infectados experimentalmente, el daño endotelial está asociado con la presencia de células remanentes de leptospiras (De Brito T y cols., 1992). La habilidad de estos microorganismos para invadir las células Vero e inducir la apoptosis en los macrófagos se correlaciona con su virulencia (Merien F y cols., 1997). Ambas propiedades se pierden rápido con el subcultivo *in vitro*. Una proteína de 36kDa que enlaza la fibronectina se identifica en una cepa virulenta de *L. Icterohaemorrhagiae* pero estaba ausente en una variante avirulenta y en una cepa saprofita (Merien F y cols., 2000).

Se ha señalado en los cultivos de leptospiras patógenas, la producción de citotoxinas y enzimas como hemolisinas, fosfolipasas, catalasas, hialuronidasas, colagenasas (Volina E y cols., 1986; Del Real y cols., 1989; Zuerner y cols., 1991). Varios investigadores consideran a las hemolisinas como el factor de virulencia más potente dentro de las toxinas producidas por *L. interrogans* (Del Real y cols., 1989; Lee y cols., 2000; 2002). Hasta hace algunos años se pensaba que la hemólisis producida por las cepas de leptospira era el resultado de la actividad de las enzimas fosfolipasas. La actividad fosfolipasa ha sido demostrada tanto en cepas saprofitas (*L. biflexa*) como patógenas (*L. interrogans*), pero sólo entre las cepas patógenas ha sido probada la actividad esfingomielinasa (Del Real y cols., 1989; Segers y cols., 1990). Otros estudios, empleando técnicas de biología molecular, han identificado al menos dos importantes hemolisinas en cepas de *L. interrogans*, con una marcada actividad hemolítica y citotóxica: la hemolisina SphA descrita en la especie genómica *L. borgpetersenii*, con actividad fosfolipasa y esfingomielinasa (Del Real y col., 1989; Segers y cols., 1990), y la hemolisina SphH descrita en el serovar Lai, que carece de actividad fosfolipasa pero muestra actividad citotóxica sobre los eritrocitos y varias células de mamíferos, al parecer, mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana de la célula diana (Lee y cols., 2000; 2002). Los genes que codifican para la nueva hemolisina SphH, formadora de poros, han sido descritos en las cepas de *L. interrogans* pero no en *L. biflexa* (Lee y cols., 2002). La importancia en la patogénesis de esta otra esfingomielinasa Sph no está determinada. Sin embargo, la reciente disponibilidad

de la secuencia del genoma de las leptospiras patógenas y saprofitas (Ren S y cols., 2003; Nascimento A y cols., 2004a; Bulach D y cols., 2006; Picardeau M y cols., 2008), unida al desarrollo de los sistemas de mutagénesis (Bourhy P y cols., 2005; Murray G y cols., 2008) permiten investigaciones más detalladas, y han definido genéticamente los mecanismos celulares y moleculares de la patogénesis en la leptospirosis. Por ejemplo, la ausencia de genes de esfingomielinasa en *L. biflexa* (Bulach D y cols., 2006), explica el papel de estas enzimas en la patogénesis.

El primer factor de virulencia genéticamente definido en las leptospiras fue la lipoproteína de superficie Loa22 con dominio OmpA (Ristow P y cols., 2007). Un mutante del transposoma de Loa22 se atenuó tanto en hámsteres como en curieles para la leptospirosis aguda. La función de Loa22 se desconoce y es notable que un homólogo de éste se encuentre en *L. biflexa*. Recientemente, el gen *hemO*, que codifica una hemo-oxigenasa (Murray G y cols., 2008) está involucrado en la virulencia en hámsteres, pero no es esencial para ésta (Murray G y cols., 2009a).

Un juego de seis proteínas de la superficie, denominadas LenA, hasta LenF, estructural y funcionalmente similar a la endostatina de los mamíferos, se une al factor H regulador del complemento (Stevenson B y cols., 2007). Es interesante conocer que estas proteínas, excepto LenA, también se unen a la fibronectina. La proteína principal de superficie, LipL32, se ha visto también enlazada a la laminina del hospedero (Hoke D y cols., 2008), como al colágeno y a la fibronectina (Hauk P y cols., 2008). LipL32 es única y muy conservada en las leptospiras patógenas. Es, por consiguiente, notable que no esté envuelta ni en la leptospirosis aguda en hámster ni en la colonización de los riñones de la rata (Murray G y cols., 2009b). Un hallazgo similar parece aplicar para las proteínas Lig expuestas en la superficie; ellas sólo están presentes en las especies patógenas y su expresión se pierde en los subcultivos, con la consiguiente pérdida de la virulencia (Matsunaga J y cols., 2003). Tanto LigA como LigB enlazan la fibronectina, y su expresión es regulada bajo condiciones de osmolaridad fisiológica (Choy H y cols., 2007). Sin embargo, la inactivación de LigB no afecta la virulencia en hámsteres (Croda J y cols., 2008). Los resultados de los estudios anteriores indican un alto grado de redundancia de proteínas de leptospiras

involucradas en la adherencia, supervivencia *in vivo* y la colonización renal, sugiriendo que será difícil identificar y definir los factores de virulencia con la simple inactivación del gen.

Otro factor de considerable importancia en la interacción patógeno-hospedero, para el caso de *Leptospira*, es la baja densidad de proteínas de transmembrana en la membrana externa de este microorganismo, lo cual puede constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que permite la persistencia del patógeno en el hospedero.

## **II.5. Manifestaciones clínicas**

Desde el punto de vista clínico, la leptospirosis humana es una enfermedad polimórfica, capaz de desarrollar un cotejo amplio de signos y síntomas, con manifestaciones que también son frecuentes en numerosas enfermedades infecciosas virales y bacterianas tales como dengue hemorrágico, influenza, meningitis aséptica, encefalitis, hepatitis anictérica, brucelosis, toxoplasmosis, malaria, fiebre tifoidea, entre otras (Faine S y cols., 1999; Levett P, 2001; Bharti A y cols., 2003; André-Fontaine G, 2006; Grooms D, 2006). Su presentación clínica es bifásica, con una fase aguda o septicémica (leptospirémica) que finaliza a la semana, seguida de la fase inmune (leptospiruria), caracterizada por la producción de anticuerpos y la excreción de leptospirosis en la orina (Levett P, 2001). La mayoría de las complicaciones de esta enfermedad está asociada con la localización del microorganismo en los tejidos durante la fase inmune, es decir, durante la segunda semana de la enfermedad.

La infección por *Leptospira* puede ser asintomática, quedando comprobada su ocurrencia por la seroconversión. Cuando es sintomática, puede causar una enfermedad febril anictérica autolimitada (85 a 90% de casos) o manifestarse bajo su forma más severa conocida como síndrome de Weil (5 a 10% de casos). Se presume, que el porcentaje de formas graves sea menor pues existe un subdiagnóstico en relación con las formas benignas que no llegan al médico o éste no las sospecha. Aunque clásicamente se describe como una enfermedad bifásica, desde el punto de vista clínico, suele ser monofásica, o porque en las formas leves la segunda fase es benigna y breve o inexistente, o porque en las formas graves ambas fases se funden.

Después de un período de incubación, entre 2 a 26 días (término medio de 5 a 14 días), la enfermedad se inicia generalmente en forma brusca, con escalofríos, fiebre elevada, mialgias y cefalea intensa. Las mialgias predominan en los músculos de las pantorrillas, así como en los músculos paravertebrales y el abdomen. Otros síntomas son: náuseas, vómitos, con menos frecuencia diarrea, postración y ocasionalmente disturbios mentales. La congestión conjuntival es característica, aunque no constante, pero de importante ayuda diagnóstica. Puede acompañarse de síntomas oculares como fotofobia, dolor ocular y hemorragia conjuntival. A diferencia de las conjuntivitis bacterianas no hay pus ni secreciones. Las lesiones cutáneas son variables: exantema eritematopapuloso, urticariforme, petequial o hemorrágico.

El antecedente epidemiológico, unido al conjunto de las manifestaciones clínicas, despierta la sospecha de leptospirosis y llevan a solicitar los estudios serológicos correspondientes. En esta etapa el germen puede recuperarse en los cultivos de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR).

Esta primera fase, de 4 a 9 días, termina frecuentemente con apirexia y regresión de los síntomas. La evolución posterior es variable. En las formas leves, el enfermo se recupera totalmente en 3 a 6 semanas. En las formas más severas, el curso de la enfermedad puede ser prolongado o bifásico.

En la segunda fase también llamada fase inmune, después de 1 a 3 días de apirexia y aparente recuperación, reaparece la fiebre y los síntomas de localización en diversos órganos. La cefalea y las mialgias son intensas. Son poco frecuentes la monoartritis migratoria y la poliartritis. En las formas anictéricas la principal manifestación de la segunda fase es la meningitis. Otras manifestaciones neurológicas poco frecuentes son: encefalitis, mielitis, parálisis de nervios craneanos, neuritis periférica y convulsiones. Son posibles los infartos encefálicos isquémicos relacionados con la panarteritis. Las manifestaciones oculares son variadas: congestión conjuntival, hemorragias, iritis, iridociclitis, coriorretinitis, coroiditis. Las manifestaciones hemorrágicas son de diferente entidad. Son frecuentes la odinofagia y tos seca o con expectoración y esputo hemoptoico. En las formas más graves,

el distrés respiratorio y la hemoptisis pueden causar la muerte. Son frecuentes también las petequias y sufusiones hemorrágicas de la piel, así como las petequias en el paladar. La insuficiencia renal, las hemorragias y las complicaciones cardiovasculares son más frecuentes en los pacientes con ictericia.

La uveítis recurrente es una manifestación crónica de la leptospirosis que se observa en los caballos (Rohrbach B y cols., 2005), pero no es única de esta especie y puede verse también en los humanos, aunque de forma ocasional. Los animales que se recuperan de la leptospirosis pueden volverse portadores asintomáticos, que portan leptospiras virulentas en los túbulos renales por períodos prolongados y diseminan leptospiras infecciosas al medio ambiente (Levett P, 2001).

## **II.6. Diagnóstico**

Debido a la gran diversidad de síntomas y signos clínicos que presenta esta enfermedad, en común con otras entidades patológicas, el diagnóstico de la leptospirosis en el hombre es difícil y en ocasiones puede ser errado (Cachay E y Vinetz J, 2005; Delgado F y cols., 2007; Gouveia E y cols., 2008). Por esta razón, el diagnóstico se basa principalmente en los exámenes de laboratorio que detectan el agente etiológico, o en aquellos que demuestran la presencia de anticuerpos en el hospedero (Zúñiga I y cols., 2008). Para un correcto diagnóstico, es importante conocer la patogenia de la enfermedad y la metodología diagnóstica a utilizar en cada etapa de la infección, así como tener en cuenta el valor y las limitaciones de las diferentes técnicas diagnósticas (Delgado F y cols., 2007).

Las leptospiras o sus componentes pueden detectarse en la orina o los tejidos mediante el cultivo, la microscopía de campo oscuro, la inmunotinción o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Faine S y cols. 1999; Levett P, 2001; Bharti A y cols., 2003). El aislamiento y la tipificación constituyen la verdadera base para el diagnóstico. El aislamiento de las leptospiras mediante el cultivo constituye el diagnóstico definitivo. Sin embargo, este método es engorroso, por el crecimiento lento de algunas cepas y los largos períodos de incubación al que deben ser sometidas. El aislamiento exitoso requiere de tejido fresco, sangre o muestras de orina, previa a la iniciación del tratamiento con

antibióticos (Faine S y cols., 1999; Levett P, 2001). La incubación del cultivo, por más de 13 semanas a 30°C, con un examen semanal al microscopio de campo oscuro, es necesaria antes de que el cultivo pueda descartarse como negativo. Un resultado negativo no es indicativo de ausencia de leptospira en la muestra. Por esta razón, el cultivo no se considera una prueba rutinaria para el diagnóstico de pacientes individuales, pero es importante para los propósitos epidemiológicos; la tipificación, en cambio, no deja lugar a dudas sobre el diagnóstico.

La MAT es la prueba diagnóstica más utilizada. Tiene la ventaja de ser específica, para los serovares o serogrupos, pero no puede diferenciar entre los anticuerpos resultantes de la infección o la vacunación. Actualmente, se considera como criterio indicativo de infección por leptospiras (dependiendo del área geográfica), un título por MAT  $\geq 160$ -400 en muestras únicas (no pareadas), en presencia de los síntomas clínicos y una historia apropiada de contacto con animales, o un incremento de cuatro veces el título en las muestras de sueros pareadas (Faine S y cols., 1999; WHO, 2003b). Tanto la sensibilidad como la especificidad de la MAT son altas. Sin embargo, la MAT puede presentar problemas también, debido al requisito de contar con cultivos vivos de serovares diferentes de leptospiras, aquellas prevalecientes en un área geográfica particular. A pesar de presentar estas limitaciones, esta técnica se considera la prueba de oro (Levett P, 2001; 2003; González A, 2003a; Delgado F y cols., 2007).

Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) se desarrollan utilizando varias preparaciones antigénicas. Estas pueden ser, desde sonicados de leptospiras hasta lipoproteínas recombinantes (LipL32, LigA), o la porina de membrana externa OmpL1. Este ensayo evita la necesidad del mantenimiento de cultivos vivos y es fácil su automatización. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad no igualan los resultados alcanzados por la MAT, y no es recomendable confiar sólo en los resultados del ELISA. Otras alternativas (la microscopía de campo oscuro, la inmunofluorescencia o la inmunoprecipitación) para la detección de leptospiras de la orina, sangre u otros tejidos, tienen baja sensibilidad y especificidad (Chaudhry R y cols., 2009). Recientemente se evaluó un **inmunoblotting** de células enteras, el que se comparó con la MAT para la diferenciación entre serogrupos de

*Leptospira* (Doungchawee G y cols., 2007). Otros métodos de detección de anticuerpos incluyen la macroaglutinación, la aglutinación por látex y el Dipstick de IgM, entre otros.

Desde los años 90, se desarrollan varios proyectos para la detección del ADN de leptospirosis en muestras clínicas, la mayoría de ellos muestran buena sensibilidad (Bomfim M y Koury M, 2006; Bomfim M, Barbosa-Stancioli E y Koury M, 2008; Fernández C y cols., 2008). Sin embargo, sólo dos de estas técnicas se evalúan con frecuencia en estudios clínicos (Brown P y cols., 1995; Merien F y cols., 1995) y se emplean para el diagnóstico. El protocolo de Merien y colaboradores, en 1995, es un ensayo género-específico que amplifica ADN de serovares patógenos y no-patógenos. Por otro lado, el procedimiento descrito por Gravekamp y colaboradores en 1993, y evaluado por Brown en 1995, requiere dos juegos de cebadores para detectar todas las especies patógenas. La sensibilidad de la técnica se mejora mediante la utilización del PCR cuantitativo con la sonda TaqMan (Slack A y cols., 2007) o fluorescencia verde SYBR (Levett P y cols., 2005a).

Los métodos modernos más fiables y robustos de caracterización de aislamientos de leptospirosis incluyen el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (Herrmann J y cols., 1992), la secuenciación del rRNA 16S (Morey R y cols., 2006), la detección de un número variable de repetidores tándem (Majed Z y cols., 2005; Slack A y cols., 2005, 2006a; Salaun L y cols., 2006; Pavan E y cols., 2008; Grissa I y cols., 2008; Zuerner R y Alt D, 2009), y recientemente se utiliza la tipificación de secuencias multisitio (Ahmed y cols., 2006; Thaipadungpanit J y cols., 2007; Victoria B y cols., 2008), la cual promete ser un método de caracterización más directo para el aislamiento de leptospirosis. Esta técnica es dócil a la estandarización a través de bancos de datos en línea (<http://leptospira.mlst.net/>), permitiendo el acceso a la epidemiología molecular actual para casi todos los laboratorios del mundo.

## **II.7. Epidemiología**

Un tercio de las muertes que ocurren en el mundo se deben a las enfermedades infecciosas. De forma general, éstas constituyen la primera causa de muerte, tanto en adultos como en niños. A comienzos del siglo XXI, causaron la pérdida de 5,7 millones de

vidas, la mayor parte en los países en vías de desarrollo. Actualmente, son responsables de 14,9 millones de muertes al año. La mitad de estas defunciones ocurren en el tercer mundo, región donde se estima que 1 500 personas mueren por una enfermedad infecciosa sólo en una hora y de ellas más de 700 son niños menores de 5 años de edad (WHO, 2003a).

Particularmente, las denominadas enfermedades zoonóticas muestran su ascenso a escala mundial. De forma general el 43,6% de las zoonosis tienen una distribución universal. De ellas, en África y Asia se reconocen el 63,3%, en América del Sur y Europa un 56%, en América del Norte el 60% y en América Central y el Caribe el 50%. La leptospirosis constituye la zoonosis de mayor importancia en América y específicamente para América Latina, región donde es objeto de vigilancia y notificación obligatoria (WHO, 2009; CDC, 2009). De manera general esta enfermedad no se vigila adecuadamente.

El estudio de la epidemiología de esta zoonosis resulta difícil. Se considera una de las enfermedades infecciosas donde el control de un brote epidémico es muy complejo (WHO, 2003b). Esta afirmación se fundamenta en factores tales como: el clima, la densidad de población y el grado de contacto entre los reservorios y huéspedes accidentales, variables que intervienen en su presentación, y dificultan la extrapolación entre las diferentes regiones geográficas, situación que obliga al conocimiento individual de cada continente, país, región o zona.

En la primera reunión de la Asociación Internacional de Leptospirosis en Nantes, Francia, en 1996, se inicia un proyecto para estimar el impacto mundial de la leptospirosis humana (Smythe L, 1999), con el objetivo de registrar los datos reales de la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad. Se estima que la incidencia varía de 0,1 a 1 x 100 000 habitantes/año en las áreas templadas, a por encima de 100 x 100 000/año durante las epidemias en los trópicos. Se calcula que 300 000 a 500 000 casos severos ocurren cada año, con una proporción de casos fatales mayor al 30% (Victoriano A, 2009; WHO, 2009; CDC, 2009).

La leptospirosis se encuentra en todo el mundo, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales dónde las condiciones medioambientales favorecen su supervivencia y transmisión. En muchos países se carece de datos epidemiológicos fiables, de manera que se hace muy difícil evaluar con precisión la carga global de esta enfermedad; pero se conocen las áreas de mayor riesgo entre las que se encuentran: la India, Sri-Lanka, Tailandia, Vietnam, Malasia, China, Seychelles, el Caribe, Brasil, y las Islas del Pacífico. Queensland, Nueva Zelanda, y Hawaii tienen algunas de las incidencias más altas notificadas en los países desarrollados (Ellis T, 2008; Colleen L, 2010).

La incidencia real de leptospirosis en la región Asia-Pacífico no está bien documentada, similar a lo que ocurre en otras regiones de mundo. Independientemente de la pobre notificación, los datos de incidencia están fuertemente comprometidos por la no disponibilidad del diagnóstico de laboratorio (Levett, 2001). Dentro de la región Asia-Pacífico, el sudeste de Asia y Oceanía tienen la incidencia más alta (Pappas G, 2008). Los mayores brotes de la enfermedad en el Suroeste de Asia se debieron a las inundaciones reportadas en Orissa (1999), Jakarta (2003) y Mumbai (2005).

En la República de China, el Ministerio de Salud informó que, desde enero del 2002 a octubre del 2007 existieron aproximadamente 1 500 casos confirmados y 50 muertes (Ministerio de Salud de China, 2008). Por su parte, las autoridades de salud de Tailandia indicaron un aumento de la incidencia de menos de 0,3 por 100 000 habitantes en 1995 a 23,7 en el 2000 (Tangkanakul W, 2005). En las Islas del Pacífico Este, entre 263 casos sospechosos de leptospirosis desde septiembre 2003 a diciembre 2005, 69 fueron confirmados en siete islas: Futuna, Raiatea y las Islas Marquesas, Vanuatu, Fiji, Palau y Wallis (Berlioz-Arthaud A, 2007). Sri-Lanka notifica una incidencia anual de aproximadamente 14 por 100 000 habitantes. En el 2007 se notificaron un total de 2 195 casos, 40% más que en el año anterior (Agampodi S, 2009)

Los datos anteriores confirman que la leptospirosis constituye aún la principal enfermedad medioambiental endémica en la mayoría de los países de la región Asia-Pacífico. Las condiciones socioeconómicas, la densidad de población, las condiciones climáticas y

ambientales, y los hábitos de comportamiento humano y su ocupación laboral son determinantes en la incidencia y prevalencia de esta enfermedad (McBride A, 2005).

En Centroamérica, durante la última década se han notificado diferentes brotes epidémicos de leptospirosis en humanos, los cuales están asociados a eventos climatológicos naturales como las intensas lluvias, las tormentas tropicales y los huracanes de mediana y gran intensidad (Kupek E y cols., 2000; SISNIVEN, 2008, Berdasquera D y cols., 2009). En octubre de 1995 en Achuapa, Nicaragua, se comunicaron 2 000 casos y más de 40 defunciones en individuos con una enfermedad febril hemorrágica, diagnosticada posteriormente como leptospirosis (OPS, 1999). Por otro lado, cuando el Huracán Mitch azotó Centroamérica (1998), ocasionó otra epidemia de leptospirosis en Honduras con 172 casos, 28 de ellos confirmados por pruebas de laboratorio y el resto por diagnóstico clínico epidemiológico, siete de estos casos resultaron fatales (Secretaría de Salud de Honduras, 1999). Nuevamente en octubre del 2007 con el paso del huracán Félix, Nicaragua notificó un total de 6 334 casos sospechosos. De ellos se confirmaron 430 por serología (ELISA-IgM), lo que representó el 6,8% del total de los casos sospechosos estudiados (Duttmann C y cols., 2008). En el 2004, de acuerdo a los estimados realizados, se consideró que la incidencia de leptospirosis en Barbados, República Dominicana, San Vicente, Jamaica y Trinidad era 12, 23, 27, 9 y  $8 \times 10^5$  habitantes, respectivamente (WHO, 2009).

En la literatura se han descrito brotes en Brasil, donde la leptospirosis se considera una zoonosis de gran magnitud, distribuida prácticamente por todo el territorio nacional y fuertemente relacionada con la presencia de roedores y las precarias condiciones de saneamiento básico (Oliveira, 2009). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), Brasil notificó en el 2008 una incidencia anual de 1,7; Costa Rica de 6,7; Colombia, 1,6 y Ecuador, 11,6 (WHO, 2009; Colleen L, 2010). En Buenos Aires, Argentina, entre el 2000 y el 2003 ocurrieron 281 casos de leptospirosis, 13 con hemorragia pulmonar de los cuales 6 (46%) fallecieron. En Bolivia, tras las intensas lluvias del 2007, se notificaron 527 casos.

La leptospirosis no está limitada a los países en vías de desarrollo. Artículos retrospectivos sobre su epidemiología se describen en Irlanda (Pate G y cols., 2000), Dinamarca (Holk K y

cols., 2000), Alemania (Jane A y cols., 2005) e Italia (Ciceroni L y cols., 2000). Todos estos autores señalan la importancia de la leptospirosis como uno de los problemas de salud pública que requiere de grandes esfuerzos gubernamentales para la vigilancia y el control de esta entidad.

En Cuba, la primera información de esta enfermedad data desde 1868 cuando el Dr. Francisco Navarro y Valdés escribe en su tesis de doctorado "La fiebre biliosa grave de los países cálidos no es la fiebre amarilla", una enfermedad ictero-hemorrágica, precedida por fiebre, que padecían algunos individuos radicados en los lugares pantanosos de este país en ciertas épocas del año (Navarro V, 1868).

La leptospirosis en Cuba tiene un comportamiento endemo-epidémico con un carácter cíclico y estacional, donde se registra históricamente la mayor morbilidad durante los meses de agosto a diciembre. Las principales dificultades confrontadas en la prevención y el control de la leptospirosis han estado asociadas con la alta infestación de roedores, la presencia de perros y cerdos en las ciudades, un deficiente tratamiento de los residuales pecuarios y una limitada disponibilidad de medios de protección, así como el régimen de lluvia.

El comportamiento de esta entidad en Cuba ha estado enmarcado en tres etapas bien diferenciadas: la primera (entre 1980 y 1990) presentó una tendencia ligeramente ascendente, la segunda (de 1991 a 1994) se caracterizó por un marcado aumento del número de casos, mientras que durante la tercera etapa (1995 a 2002), se observó una franca reducción, la cual se mantuvo hasta 2004, pues durante 2005 el número de casos se incrementó.

En 1980 ocurre un brote de gran magnitud en cortadores de caña de azúcar ubicados en la provincia Camagüey (Cruz R y cols., 1998). En 1983 se introduce, por primera vez en Cuba, el control profiláctico de la leptospirosis, mediante la vacunación del personal de riesgo con una vacuna proveniente de la antigua Unión Soviética, compuesta por cuatro serovares (*Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Grippityphosa* y *Hebdomadis*), vacuna que se

aplica hasta finales del año 1991 (Martínez R y cols., 1998; González M y cols., 2004). Debido a la caída del campo socialista, se deja de recibir la vacuna de la URSS. Esta situación, unida al advenimiento del Período Especial y el consiguiente deterioro de las condiciones higiénico-sanitarias del país, hacen que la leptospirosis muestre una tendencia ascendente, incrementándose su incidencia en casi todas las provincias (Martínez R y cols., 1998; González M y cols., 2004). A partir de ese momento, la leptospirosis se convierte en un serio problema de salud para nuestra población en general, dejando de ser solamente una enfermedad de los grupos de riesgo.

La evolución de la leptospirosis humana durante el período comprendido entre 1991 a 1994, se caracteriza por mantener una tendencia ascendente en la morbilidad y ligeramente descendente en la letalidad (Ministerio de Salud Pública 1991; 1992; 1993; Martínez R y cols., 1998). Las provincias de Villa Clara, Ciego de Ávila, Camagüey y Cienfuegos son las más afectadas y los meses de octubre, noviembre y diciembre muestran el mayor número de casos notificados (Man Kala, 1992). Los serovares de mayor circulación correspondieron a Canicola, Copenhageni y Mozdok (González M y cols., 1997; 2004). El año 1994 fue el más crítico, reportándose 2 828 casos de leptospirosis, con una tasa de incidencia de 25,6 x 100 000 habitantes y 52 fallecidos (Cruz R, 1998; González M y cols., 2004). La letalidad se mantuvo en 1,8%, situación que conlleva al establecimiento de un Plan de Acción Emergente, el cual logra mantener, desde 1995, una reducción sostenida de la morbilidad.

Durante los últimos cinco años ocurren brotes en diferentes provincias del país: Villa Clara (1998), Ciudad de La Habana (2002, 2005 y 2006), Guantánamo y Santiago de Cuba (2005), notificándose tasas de incidencia muy superiores a la media nacional (Berdasquera D y cols., 2007a; Berdasquera D y cols., 2007b; Barroso J, 2008; Berdasquera D y cols., 2009). Durante los años 2005 y 2006, en la Ciudad de La Habana se notifican 68 casos de leptospirosis humana, 37 (54,4%) durante el 2005 y 31 (45,6%) en el 2006 (Barroso J, 2008; Berdasquera D y cols., 2009). En esta provincia se observó un aumento en el número de fallecidos por leptospirosis durante el año 2006; (31,9% de todos los fallecidos del país), año en el que se alcanzó una de las más altas tasas de mortalidad y letalidad de esta

zoonosis en el país (0,4 por cada 100 000 habitantes y 8,8% respectivamente) (Araceli B, 2008). En los casos confirmados, correspondientes a todos estos brotes, de forma general, se observó que los serogrupos de *Leptospira* predominantes fueron Ballum, Pomona, Canicola, Icterohamorrhagiae, Sejroe y Pyrogenes (Rodríguez I y cols., 2007).

## **II.8. Modelos animales utilizados para estudiar la leptospirosis**

Al ser una enfermedad zoonótica que ataca a casi todos los mamíferos, la leptospirosis y su evolución patológica han sido estudiadas en una gran variedad de especies animales de interés para el hombre. Sin embargo, existen modelos animales de laboratorio que han sido utilizados con frecuencia por los investigadores para el estudio de la patogénesis de la enfermedad, la evolución de la inmunogenicidad, inocuidad y capacidad protectora de preparados vacunales, y la expresión *in vivo* de antígenos relevantes. Hámsteres (Barnett J y cols., 1999; Matsunaga J y cols., 2002), curieles (González A, 2003a), ratones jóvenes o inmunodeprimidos (Dai B y cols., 1997), gerbils (Sonier C y cols., 2000; Branger C y cols., 2001) y ratas (Athanazio D y cols., 2008) son muy utilizados para estos fines, pero es sin dudas el Hámster Sirio (*Mesocricetus aureatus*) el modelo animal más empleado. Los hámsteres son considerados los animales de laboratorio más susceptibles a la leptospirosis (Oliva R y cols., 1998). Estos animales reproducen con gran fidelidad el proceso clínico patológico de la leptospirosis humana, teniendo en cuenta sus características biológicas y el conocimiento acerca de los aspectos sanitarios y genéticos que sobre la misma se tienen (Infante J y cols., 1998; Oliva R y cols., 1998).

## **II.9. Inmunidad**

Está bien documentado que el desarrollo de una respuesta inmune humoral durante la leptospirosis es importante para la resistencia a la infección (Levett P, 2001). Dicha inmunidad parece depender de la producción de anticuerpos aglutinantes y opsónicos, ambos dirigidos contra los determinantes antigénicos serovar o serogrupo específicos (Silva E y cols., 2008). La inmunidad pasiva puede ser conferida solamente por anticuerpos (Adler B y De la Peña M, 2009). Se reconoce además, la respuesta inmune a leptospira mediada por células (Ratnam S y cols., 1994). Sin embargo, se describe también la

supresión de esta respuesta (Welsh J y McClelland M, 1990) con una reducción del número de linfocitos CD4+ y su respuesta a algunos antígenos.

Hasta hace algunos años todos los antígenos protectores que se habían logrado identificar eran de naturaleza glicolípida. Aunque los identificaron de diferentes formas (F4, TM, PE, Pag, LLS, LPS), está claro que todos se derivan del LPS de *Leptospira* y presentan características distintivas en cuanto a su actividad biológica y endotóxica. La protección conferida por estos lipopolisacáridos es serovar específica (Masuzawa T y cols., 1990a; Midwinter A y cols., 1990; Chapman A y cols., 1991) y muchos de los genes relacionados con su biosíntesis ya han sido dilucidados (De la Pena M, Bulach D y Adler B, 2001).

Se piensa que entre los componentes de la membrana externa del patógeno, el LPS es la biomolécula capaz de inducir una respuesta inmune protectora en las vacunas de células enteras de leptospirosis aplicadas en los animales domésticos y en los humanos (Nally J y cols., 2005a). Desdichadamente, los antígenos del LPS varían entre los diferentes serovares. Se señala también, que algunas proteínas de esta membrana son capaces de potenciar la respuesta al LPS, induciendo niveles superiores de protección en los hámsteres (Jost B, Adler B y Faine S, 1989). En contraste con el LPS, se cree que estas proteínas están conservadas (Biswas D y cols., 2005). Por esta razón, hay un intenso interés en ellas, para el desarrollo de pruebas serodiagnósticas confiables, y la obtención de vacunas efectivas para la protección contra los riesgos individuales (Haake D y Matsunaga J, 2005).

No es hasta el año 1994 que se describen tres clases de PME que actúan como antígenos protectores: proteínas de transmembrana, lipoproteínas y las proteínas periféricas (Branger C y cols., 2001; Haake D y Matsunaga J, 2002). Estas proteínas interactúan con el sistema inmune del hospedero y son blancos de anticuerpos aglutinantes, opsonicos y fijadores de complemento, fundamentalmente del tipo IgG (Guerreiro H y cols., 2001).

OmpL1, una de las que primero se describe, parece tener al menos 10 segmentos de transmembrana, los que posiblemente son responsables de su movilidad electroforética

(Boonyod D y cols., 2005; Maneewatch S y cols., 2007). En cambio Omp52, una de las identificadas recientemente, de 52,6 kDa, posee un dominio consenso OmpA C-terminal y, al parecer, interviene en la interacción entre la célula hospedera y el patógeno, durante la infección (Hsie W y cols., 2005).

La segunda clase de PME (lipoproteínas) se encuentra anclada a la envoltura externa por ácidos grasos unidos a una cisteína amino terminal, y se estima que existan al menos cinco en la membrana externa. Un estudio reciente sobre la identificación del conjunto de PMEs existentes en la célula bacteriana, detecta que este conjunto está constituido principalmente, por un pequeño número de proteínas ya caracterizadas, en el siguiente orden relativo de abundancia: LipL32 > LipL21 > LipL41 > LipL45 > LipL48. De ellas, sólo LipL32 no ha sido identificada como una proteína expuesta en la superficie (Cullen P y cols., 2005). Es bien conocido que LipL32, es la más notable en el perfil proteico y que es un antígeno inmunodominante durante la leptospirosis humana (Flannery B y cols., 2001). Además, se ha mostrado que LipL32 induce una significativa protección contra el reto en el modelo Hámsters Sirio (Seixas F y cols., 2007). De LipL41 se sabe que provee inmunoprotección sinérgica con OmpL1, lo que las hace candidatos potenciales para una vacuna (Haake D y Matsunaga J, 2002). Otras lipoproteínas se describen en la literatura como Q1p42 y LipL36, expresada *in vitro*, pero no *in vivo* y Loa22, localizada en la envoltura externa de las cepas patógenas, y asociada con la virulencia (Cullen P y cols., 2002; Haake D y Matsunaga J, 2002; Koizumi N y cols., 2003a; Nally J y cols., 2005b).

De las PMEs del tercer grupo (proteínas periféricas), se sabe que P31<sub>Lip45</sub> se exporta como una lipoproteína de 45 kDa y se procesa en la forma de 31 kDa C-terminal que se asocia con la envoltura externa (Haake D y Matsunaga J, 2002).

En general, las PMEs son proteínas inmunogénicas asociadas con las cepas patógenas de *Leptospira* y los anticuerpos que se enlazan a ellas son útiles para el diagnóstico de la leptospirosis (Okuda M y cols., 2005). Estas proteínas son capaces de inducir una respuesta inmune contra las leptospirosis patógenas, respuesta comparable con la inducida frente a una inmunización con células completas (Yan Y y cols., 2003), y lo que es más

importante, previenen la infección renal (Schreiber P y cols., 2005). Además, se reconoce que algunas de ellas son género específica (Luo Y y cols., 2004) y están involucradas en la infección, transmisión, virulencia, supervivencia y adaptación a las condiciones ambientales de *Leptospira*, además de ser excelentes candidatos para vacunas de ADN (Koizumi N y cols., 2003a; Cullen P y cols., 2005; Gamberini M y cols., 2005; Hsie W y cols., 2005; Nally J y cols., 2005b; Okuda M y cols., 2005).

No obstante, hay que señalar que las nuevas investigaciones sugieren que no sólo la membrana externa es atractiva desde el punto de vista inmunológico, sino que la membrana interna también lo es, por contener elementos relacionados, al parecer, con la virulencia. Tal es el caso de la llamada Lag42, proteína de 42 kDa, cuya localización del gen que la codifica se conserva entre las leptospirosis patógenas y no entre las no patógenas (Koizumi N y cols., 2003b). Además, en la membrana interna ha sido descrita la expresión de la lipoproteína LipL31 y de la proteína de transmembrana ImpL63 (Haake D y Matsunaga J, 2002).

Otros antígenos inmunodominantes son las proteínas citoplasmáticas de shock térmico: GroEL (64, 70, 14 y 15 kDa) y DnaK (76 kDa). Estas proteínas “chaperonas” incrementan significativamente su expresión a elevadas temperaturas del hospedero (Stamm y cols., 1991; Ballard y cols., 1993; Ballard S y cols., 1998) y son reconocidas por el suero de pacientes con leptospirosis, tanto en la fase aguda como durante la convalecencia (Guerreiro H y cols., 2001). Otro antígeno inmunodominante, reconocido por el suero de pacientes convalescentes y de vacunados, son las proteínas flagelares de 35-36 kDa (Chapman A y cols., 1991; Cinco M, Delneri D y Banfi E, 1992). La mayoría de estos antígenos proteicos, a diferencia del LPS, están conservados entre las diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*. En los últimos años, ellos se han asociado al establecimiento de una inmunidad cruzada entre serogrupos diferentes (Sonier C y cols., 2000; Branger C y cols., 2001, González A, 2003a; Maneewatch S y cols., 2007).

## II.10. Inmunización y vacunas

La inmunización ha sido, por muchos años, utilizada para inducir inmunidad en los animales y en los humanos, aunque con algunas limitaciones. Las primeras vacunas, compuestas por suspensiones de leptospiras inactivadas y cultivadas en medio con suero, ocasionan efectos colaterales tras su aplicación. Las vacunas modernas, preparadas con un medio libre de proteínas, no tienen efectos adversos (Adler B y De la Peña M, 2009). La inmunización protege sólo contra la enfermedad causada por serovares homólogos o serovares antigénicamente similares (Sonrier C y cols., 2000; Adler B y De la Peña M, 2009). Todo lo anterior indica que las vacunas deben contener los serogrupos representativos de los que están presentes en la población que será inmunizada.

La mayoría de las vacunas contra la leptospirosis disponibles hasta el momento, tanto para uso humano como animal, son suspensiones de células completas inactivadas por métodos físicos (calor) o químicos (formaldehído o fenol) (WHO, 2003a), cuya concentración antigénica promedio, por serovar y por dosis se encuentra entre  $1-5 \times 10^8$  células. Entre estas vacunas tenemos:

- Vacuna china polivalente fenolada:  $2 \times 10^8$  células/mL de cada serovar en dosis de 1 mL. Sustituida debido a su reactogenicidad por una vacuna de proteínas de membrana externa.
- Vacuna japonesa combinada mono o polivalente fenolada:  $2,5 \times 10^8$ - $5 \times 10^8$  células/mL en dosis de 1 mL.
- Vacuna coreana monovalente (*L. Icterohaemorrhagiae*) fenolada:  $2,5 \times 10^8$  células/mL en dosis 1 mL.
- Vacuna rusa polivalente (Hebdomadis-Pomona-Ictero-Grippotyphosa) inactivada con calor y fenolada: dos dosis de 2 y 2,5 mL. Mejorada en la actualidad con una sola dosis de 0,5 mL.
- Vacuna israelí bivalente (*L. Szwajizal* y *L. Grippotyphosa*) inactivada con formaldehído:  $2 \times 10^8$  células/mL en dosis de 1 mL.

Además, desde los años 80 se encuentra en el mercado una vacuna francesa de Pasteur Mérieux, cuyo nombre comercial es SPIROLET. Este fármaco es una suspensión de células inactivadas (*L. Icterohaemorrhagiae*),  $2 \times 10^8$  leptospiras/mL y se aplica por inyección

subcutánea (dos dosis, con 15 días de intervalo, la tercera dosis se pone a los 4-6 meses de la primera, con una revacunación bianual) (Van Butsele, 2006).

Todas las vacunas antes mencionadas pueden ser monovalentes o polivalentes y se inoculan por vía subcutánea, con un esquema de dos dosis y un intervalo de siete días; a excepción de la vacuna israelí, cuyo esquema es con un intervalo de 21 días entre dosis. Además confieren una protección en humanos, por un periodo no mayor de 1 año, existiendo casos en los que, en periodos epidémicos se requiere una revacunación a los seis meses de concluido el esquema (Chen T, 1986). Estas vacunas inducen, además, una protección serogrupo/serovar específica, sobre todo del tipo humoral (Levett P, 2001; González A y cols. 2003b; Fernández Y y cols., 2005). Sin embargo, existen otras vacunas como la vacuna cubana (vax-SPIRAL<sup>®</sup>) donde las evidencias indican una mayor duración de la protección y la existencia de una protección parcial hacia serogrupos no incluidos en su formulación (Instituto Finlay, 1998)

La transmisión urinaria es el único modo conocido para la diseminación natural de leptospiras entre los animales y el hombre, de ahí que la capacidad del inmunógeno para prevenir la infección renal sea relevante en el control de la leptospirosis (Faine S y cols., 1999; Schreiber P y cols., 2005). Por ello, se debe trabajar en el desarrollo de una nueva generación de vacunas más efectivas, basadas en preparaciones de los componentes de la membrana externa de *Leptospira interrogans*.

En 1973, Shenberg y Torten desarrollaron la primera vacuna antileptospirósica para uso humano elaborada con leptospiras crecidas en medio completamente sintético libre de proteínas (Shenberg E y Torten M, 1973). En la actualidad muy pocos países aplican vacunas antileptospirósicas de uso humano (Colleen L, 2010). La inmunización de animales se encuentra más extendida, principalmente en países desarrollados como Estados Unidos, Australia y los países de la Europa occidental (Faine S y cols., 1999; Levett P, 2001; Colleen L, 2010), donde las vacunas humanas no han sido ampliamente aplicadas.

Las vacunas de subunidades son atractivas como estrategia de intervención contra la leptospirosis y prometen ser eficaces (Palaniappan R y cols., 2006; Chang Y y cols., 2007; Faisal S y cols., 2008; 2009b; Thongboonkerd V, 2008; Feng C y cols, 2009; Yan W, 2009). Sin embargo, el éxito de estas vacunas se ha visto obstaculizado por la inmunidad débil y de corta duración, lo que requiere la co-administración de adyuvantes potentes no tóxicos (Faisal S y cols., 2009a), evidenciando la necesidad de nuevas estrategias de vacunas para prevenir la leptospirosis. La secuenciación del genoma completo de *Leptospira interrogans* serovar Lai cepa Lai (Ren S y cols., 2003) y Copenhageni (Nascimento A y cols., 2004b) representa un nuevo e inexplorado campo para el diseño de nuevas vacunas, así como para la predicción de la inmunoreactividad de las lipoproteínas de membrana externa.

Muchos estudios moleculares y celulares se han llevado a cabo en leptospirosis, que incluyen los potenciales factores de virulencia y características del LPS y de las PMEs. Estudios de las PMEs de leptospirosis (Haake D y cols., 1991) las han identificado como potenciales candidatos vacunales.

Las vacunas de ADN se aprovechan del hecho que el plásmido de ADN puede directamente transfectar las células animales y producir proteínas *in vivo* (Wolff J y cols., 1990). Esto hace posible inducir una respuesta inmune mediante la inyección directa de los plásmidos de ADN que codifican para proteínas antigénicas en las células animales. Las vacunas de ADN proporcionan la expresión prolongada del antígeno, amplificando la respuesta inmune, y ofrecen varias ventajas como la construcción fácil, costo bajo de fabricación de grandes biomasas, estabilidad a altas temperaturas, y capacidad para inducir respuesta inmune humoral y mediada por células (Mor G y cols., 2001; Alpar H y cols., 2002). Sin embargo, presentan algunas limitaciones relacionadas con su seguridad.

En Cuba se produce y aplica una vacuna antileptospirosis trivalente diseñada para establecer protección en los humanos con alto riesgo frente a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, la cual ha tenido un papel importante en el control y reducción de la morbilidad de la leptospirosis humana en todo el país (Martínez R y cols., 2004). Durante los estudios preclínicos de esta vacuna en modelos animales se pudo

comprobar que la formulación propuesta era inmunogénica y protectora, capaz de proteger contra aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas vacunales altamente virulentas. Los estudios anatomopatológicos y toxicológicos evidenciaron la inocuidad y la no toxicidad del producto (González M y cols., 1997). Esta vacuna pasó satisfactoriamente las fases clínicas de su evaluación, con los siguientes resultados:

#### Ensayo clínico Fase I. Evaluación de la seguridad del producto.

- No se notificaron eventos adversos graves durante los estudios realizados.
- La duración de las reacciones adversas no excedió las 72 horas.
- Los síntomas y signos fueron ligeros y no se incrementaron con la segunda dosis.
- La reacción local más frecuente fue el dolor, apareció durante las primeras 12 h, con un alivio espontáneo.
- Las reacciones generales más frecuentes fueron: febrícula, malestar general y cefalea, en un bajo porcentaje de vacunados.
- Ninguno de los voluntarios requirió interrumpir las actividades diarias.

#### Ensayo clínico Fase II. Inmunogenicidad.

- Se demostró la inmunogenicidad de la vacuna y la respuesta a cada uno de los serovares implicados en la formulación.

#### Estudio clínico Fase III. Eficacia (1998-1999).

- Se vacunaron 101 832 voluntarios de 20-64 años.
- Control de casos: 12 casos en vacunados (2,38 x 100 000); 56 casos en no vacunados (6,69 x 100 000)
- Se obtuvo una eficacia serogrupo específica de un 78,1%
- Se obtuvo una eficacia de un 60,4% hacia otros serogrupos no incluidos en la vacuna.

#### Ensayo clínico Fase IV. Efectividad (1996-1997).

- Estudio caso control, personal de riesgo. Vacunados: 101 137, no vacunados: 16 881.
- Efectividad de un 97%.

En Cuba, esta vacuna se ha aplicado a más de 5 752 891 personas desde 1996 a 2008, fundamentalmente a la población de alto riesgo.

#### **II.11. *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum: situación actual**

El serogrupo Ballum se reconoce como un taxón que agrupa cepas de crecimiento fastidioso, con requerimientos nutricionales más exigentes que otras cepas patógenas de *Leptospira* (Johnson R y cols., 1973; González A, 2003c).

En 1992, se describe en Cuba el primer brote de leptospirosis humana con el serogrupo Ballum en un grupo de cadetes de la Escuela Interarmas “Antonio Maceo” en la provincia de Pinar del Río. Los hemocultivos realizados permitieron un 97,6% de aislamientos positivos (40/41) y la clasificación serológica en el Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario define que todas las cepas pertenecían a este serogrupo (González M y cols., 2004).

En 1996 el MINSAP señala que los estudios serológicos indicaban a este serogrupo como la tercera causa de infección en los humanos y la segunda en los roedores. Bajo estas condiciones se realizan los estudios de efectividad de vax-SPIRAL<sup>®</sup>, investigaciones que tuvieron como escenario la provincia de Holguín, en la que se evidenciaba una incidencia al serogrupo Ballum (42%), Pomona (41%) y Canicola (13%) (Rodríguez I y cols., 2002). Esta situación representó un reto para la vacuna, puesto que este serogrupo no está incluido en dicha formulación. Como ya se expresó, la mayoría de los trabajos de la literatura plantean que la inmunidad a la leptospirosis parece depender de la producción de anticuerpos aglutinantes y opsónicos, dirigidos fundamentalmente contra los antígenos serovar o serogrupo específicos (Vinetz J, 2001; Bharti y cols., 2003). Aunque es bueno destacar que existen trabajos acerca de la existencia de una inmunidad cruzada entre los diferentes serogrupos (Branger C y cols., 2001). No obstante, los resultados obtenidos en el ensayo clínico fase IV muestran una efectividad de 97% (Martínez R y cols., 2000), pudiéndose inferir la existencia de una protección cruzada contra el serogrupo Ballum.

Estudios epidemiológicos indican la existencia de al menos, ocho serogrupos no incluidos en la formulación vacunal actual y cuya incidencia en algunos casos comienza a constituir un problema epidemiológico (Rodríguez I y cols., 2002). Estudios serológicos realizados en el año 2002, donde se estudiaron 228 cepas de leptospiras obtenidas a partir de hemocultivos de pacientes con leptospirosis humana, procedentes de diferentes regiones del país (7 provincias), mostraron la circulación de serogrupos comunes como: Ballum, Pomona y Canicola, aunque se encuentran algunos específicos en determinadas regiones. De forma general se detectaron 11 serogrupos diferentes y prevaleció Ballum 55,7% (127/228), seguido por Pomona 22,8% (52/228) y Canicola 14,03% (32/228) como los principales, aunque también se encontraron otros serogrupos como Icterio 1,75 % (4/228), Tarassovi 1,31 % (3/228), Australis 0,87 % (2/228), Hebdomadis 0,87 % (2/228), Sejroe 0,43 % (1/228) y otros que no habían sido aislados de pacientes con leptospirosis humana en Cuba como: Pyrogenes 1,31 % (3/228), Autumnalis 0,43 % (1/228) y Bataviae 0,43 % (1/228). Estos dos últimos se aíslan y pre-caracterizan en una misma región (Pinar del Río), mientras que el primero se aisló en tres regiones diferentes pertenecientes al occidente, centro y oriente del país. El serogrupo Ballum se encontró en el 64,6% (82/127) de los aislamientos logrados en la provincia de Holguín, 60% (3/5) de Matanzas, 53,8% (7/13) de Las Tunas, 49,2 % (32/65) de Villa Clara, 20% (3/15) de Ciudad Habana. Estos resultados indican que el serogrupo Ballum pasó a ser la principal causa de aislamientos clínicos en todo el país (Rodríguez I y cols., 2002).

Esta situación epidemiológica se mantuvo durante los meses de octubre-diciembre de 2005 cuando se produjeron dos eventos epidemiológicos en humanos, en dos provincias del país. Las principales serovariedades de leptospiras detectadas serológicamente en estos pacientes fueron, en orden decreciente, Canicola, Ballum, Icterio y Pomona. (Rodríguez I y cols., 2007). Finalmente, en el período 2002-2006 se confirmaron 203 casos pertenecientes a cuatro brotes epidémicos en los cuales se observó que los serogrupos de *Leptospira* predominantes fueron Ballum, Pomona, Canicola, Icterio, Sejroe y Pyrogenes. Obsérvese que en el período 2002 a 2006, continúan predominando los serogrupos Ballum, Pomona, Canicola, Icterio y Sejroe (Obregón A y cols., 2007).

A pesar de la importancia que presenta el aislamiento y caracterización de cepas de leptospiras, no sólo desde el punto de vista epidemiológico y de la formulación de preparados vacunales, sino también por la asociación que se puede establecer entre éstas con determinados cuadros clínicos, no se ha podido extender este estudio en todas las provincias del país, dadas las características especiales que tiene el hemocultivo que requiere medios de cultivos específicos, muy ricos y fácilmente contaminables, así como necesita largos períodos de incubación debido a la lenta velocidad de crecimiento de esta bacteria. Es por ello que no se cuenta con investigaciones anteriores similares en extensión al estudio antes mencionado.

Aunque los centros diagnósticos para el control de la leptospirosis dentro de los países de la región caribeña y en otras regiones donde esta enfermedad constituye un problema de salud han aumentado, muchos no brindan información de los serovares circulantes; información que ayuda a la comprensión de la epidemiología y transmisión de la enfermedad en los humanos. Otros factores que contribuyen a la no notificación son la falta de vigilancia activa y la ausencia de información importante como: la ocupación, las actividades recreativas y diarias, síntomas experimentados, así como el estado socio-económico de los pacientes, los cuales son importantes para aumentar el conocimiento entre la población. Esta falta de información también es común a muchos otros países que carecen de los medios diagnósticos apropiados, que a menudo frustran a investigadores que intentan determinar el estado exacto de la enfermedad en sus respectivos países.

En la India, un estudio multicéntrico muestra que los serovares predominantes son Copenhageni, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Canicola, Australis, Javanica, Sejroe, Louisiana, y Pomona (WHO, 2006; Sehgal S, 2003). En Nueva Zelanda, un análisis de tendencia en un periodo de nueve años (1990-1998) reveló un cambio en el modelo epidemiológico de la leptospirosis, con la emergencia del serovar Ballum como una de las causas más frecuentes de infección en humanos (Thornley C, 2002). Algo similar sucede en Australia donde la emergencia de *L. borgpetersenii* serovar Arborea alcanza el 22% de todos los casos de leptospirosis en Australia y 68% de los casos del Sureste Queensland en 2004 (Slack T, 2006b).

La información sobre los serovares de *Leptospira* prevalecientes entre los humanos en Filipinas data de los años 1960 y 1970, cuando los anticuerpos contra los serovares Pyrogenes, Bataviae, Pomona, Grippotyphosa, Manilae y Javanica eran los prevalecientes (Yanagihara Y, 2007). En Japón, se han reconocido los serovares Ictero, Copenhageni, Autumnalis, Hebdomadis y Australis como los causantes principales de la leptospirosis humana (Yanagihara Y, 2007). Mientras que, en Corea, se aislaron los serovares Lai, Copenhageni y Canicola desde 1984-1990 (Victoriano A, 2009).

Vietnam, Camboya y Laos han sido considerados países endémicos para la leptospirosis. En 2002, se notificaron los serovares Hurstbridge, Bataviae e Ictero como predominantes; identificados en pacientes con ictericia clínica (Laras K, 2002). El serovar Bataviae, fue el más aislado de los pacientes con enfermedad febril no malárica y los serogrupos Pyrogenes y Hurstbridge fueron identificados entre los pacientes con fiebre hemorrágica. Un estudio en la provincia de Takeo, Camboya estimó una incidencia anual de 7,65 por 100 000 habitantes con los serogrupos Javanica y Australis como principales (Seng H, 2007). En las Islas del Pacífico Este, los presuntos serogrupos dominantes fueron Ictero y Australis, indicando la relación con los reservorios de roedores (Berlioz-Arthaud A, 2007)

En los reportes de Barbado del 2004 se indican los serovares Bim, Copenhageni y Arborea como los más encontrados por aislamiento (Everard C, 1995). Mientras que los datos del Departamento de Epidemiología de la República Dominicana señalan que en 1999 de los 25 casos sospechosos, 10 de ellos se confirmaron como serovares Icterohaemorrhagiae, Canicola y Hardjo (Mohan A y cols., 2009).

Un estudio de seroprevalencia en barrios periféricos de Cali, Colombia describe que los serovares con mayor reactividad fueron Grippotyphosa, Seramanga, Ictero, Panama, Pomona, Cynopteri, Bataviae, Sejroe, Australis y Canicola (Ferro B, 2006). A diferencia de lo notificado en otras regiones como México, donde los principales serogrupos implicados en la respuesta serológica evaluada fueron Tarassovi, Hardjo, Pomona y Panama (Vado I, 2002), y Brasil, donde un estudio de seroprevalencia durante 29 años (1969-1997) en Sao Paulo detecta que la respuesta serológica está dirigida casi exclusivamente al serogrupo

Ictero (54,8%). Aunque también se encontró respuesta a los serogrupos Canicola (4,29%) y Ballum (1,88%) entre otros (Romero E, 2003).

La enfermedad en Honduras se hizo presente desde el huracán Mitch (1998). Actualmente se manifiesta en San Pedro Sula y Choluteca. Un estudio realizado en San Pedro de Marcovia (657 muestras en el año 2001) mostró una positividad por MAT de 21.56%. Los serovares más frecuentes fueron Ictero, Canicola y Ballum (Vijayachari P y cols., 2008).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### III.a. Materiales y métodos generales

##### III.a.1. Animales de experimentación

En este trabajo se utilizó el biomodelo animal Hámsters Sirio (*Mesocricetus aureatus*) de ambos sexos, con un peso entre 45-60 g, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba) y recepcionados con sus correspondientes certificados de calidad higiénico-sanitaria y genética.

Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24°C), humedad (20-25%), ciclo alternado de luz/oscuridad de 12 h y recibieron alimentación y agua acidulada con HCl a un pH 2,5 *ad libitum*. El alimento fue suministrado por el CENPALAB y éste consistió en pienso concentrado para roedores, con sus correspondientes certificados de calidad bromatológica e higiénico-sanitaria. Para todos los experimentos, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en cajas modelo T3 (Macrolón, TECNIPLASTIC) y en grupos individuales de 5 a 6 animales por caja, utilizando como encamado el bagazo de caña de azúcar desmeollado con previa esterilización en autoclave a 121°C y 1,5 atmósfera de presión durante 25 min; el cual se cambió dos veces por semana.

Todas las operaciones de esta investigación se realizaron siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) (OECD, 1992; WHO, 2003b), establecidas en los Procedimientos Normalizados de Operaciones (PNO), elaborados por la Dirección de Calidad del Instituto Finlay y se tuvieron en cuenta las normas y regulaciones bioéticas vigentes nacionales e internacionales (SNSA, 2000). En el diseño, la ejecución y la evaluación de los trabajos que implicaron el uso de los animales de experimentación se cumplieron los principios generales bioéticos, así como el manejo de los animales de laboratorio.

Todos los diseños experimentales, incluyendo los métodos de eutanasia, se realizaron con la autorización y aprobación de la Comisión de Ética del Instituto Finlay, observándose lo establecido por las regulaciones de seguridad biológica.

### **III.a.2. Observación clínica y estudios anatomopatológicos**

Los animales se sometieron a una observación clínica durante 14 días, evaluándose la aparición de signos clínicos tales como: piloerección, excitabilidad, íctero de la piel y las mucosas, hemorragias a través de los orificios nasales, postración y muerte.

Los estudios anatomopatológicos se realizaron por los métodos convencionales, utilizando la técnica descrita por Capo (Capo M, 1999) para la eutanasia y por Castillo (Castillo F, 1985) para la necropsia. Se realizaron observaciones macroscópicas de los órganos *in situ* y se tomaron muestras para los estudios histopatológicos de los tejidos que se consideraron útiles, los que se fijaron en formol neutro al 10%, para su tinción con Hematoxilina-Eosina y Warthyn Starry (Oliva R y cols., 1998).

### **III.a.3. Prevalencia de *Leptospira* en los órganos**

Se tomaron muestras de los órganos considerados como diana de la enfermedad leptospirósica (hígado y riñón) de los animales que sobrevivieron al reto, tanto de los experimentos de protección activa, como del experimento de inmunización pasiva, para el aislamiento de *Leptospira*. Las muestras se sembraron en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) y se incubaron a 28°C durante 60 días, evaluándose periódicamente el crecimiento mediante la observación microscópica de campo oscuro (Naiman B y cols., 2002).

### **III.a.4. Vacuna empleada**

Para los ensayos de inmunización con la vacuna cubana antileptospirósica (vax-SPIRAL®) se emplearon los lotes 0031, 7001, 8027X y 9009. Todos fueron obtenidos en condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación en el Instituto Finlay, lotes que fueron liberados satisfactoriamente por la Dirección de Calidad del mismo Instituto y por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). La composición por dosis de vacuna (0,5 mL) fue de:  $5-8 \times 10^7$  células enteras inactivadas de (*Leptospira* Canicola Canicola, *Leptospira* Icterohaemorrhagiae Copenhageni, *Leptospira* Pomona Mozdok), 1 mg de gel de Hidróxido de Aluminio y 0,05 mg de Tiomersal.

### **III.a.5. Inmunización**

En todos los casos se utilizó la vía, dosis y esquema de inmunización recomendado por González y cols (2004): Dos dosis de vacuna de 0,5 mL, por vía intramuscular (IM) en la cara interna de cada extremidad posterior (en un volumen de 0,25 mL), separadas por un intervalo de seis semanas.

### **III.a.6. Toma de muestras de sangre de los animales inmunizados**

La extracción de sangre de cada uno de los animales, se realizó mediante punción retroorbital, utilizando capilares heparinizados. Las muestras de sangre obtenidas se incubaron durante 1 h a 37°C; posteriormente se centrifugaron a 15 000 g durante 10 min para la extracción del suero. Todas las muestras se conservaron a -20°C hasta su evaluación.

### **III.a.7. Retos**

El reto se realizó 14 días después de completar el esquema de inmunización, por vía intraperitoneal (IP) con la(s) dosis de reto y las cepas correspondientes, según el ensayo, empleando 10 animales por cada variante de reto y 0,5 mL como volumen de inóculo.

### **III.a.8. Cepas bacterianas**

La selección de las cepas candidatas vacunales se realizó a partir de 53 aislamientos clínicos de *Leptospira* procedentes del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Holguín. Estos aislamientos se obtuvieron de personas con sintomatología compatible con una leptospirosis en diferentes centros asistenciales de esta provincia entre enero de 1999 y diciembre de 2004. Todas las cepas se aislaron por hemocultivo en el medio Korthof (Korthof G, 1932, Terpstra W y cols., 2000).

Como controles en los diferentes ensayos se utilizaron las cepas vacunales 87, 169 y 108, pertenecientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente, integrantes de la vacuna trivalente vax-SPIRAL®. Estas cepas se aislaron originalmente a partir de un material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana y donadas al Instituto Finlay.

Todas las cepas se conservaron en el medio semisólido Fletcher a 28-30°C (Fletcher W, 1928) y se mantuvieron siempre mediante cultivos semanales en el medio proteico EMJH, bajo condiciones estáticas a 28-30°C (Ellinghausen H y McCullough W, 1965a; Johnson R y Harris V, 1967) en el Departamento de Microbiología de la Vicepresidencia de Investigaciones del Instituto Finlay. La virulencia de las cepas vacunales y de los aislamientos clínicos se mantuvo a través de pases periódicos en hámsteres, según los métodos descritos (Faine S, 1982).

Para la clasificación serológica se emplearon antisueros policlonales de referencia específicos de los serogrupos: Ballum, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Tarassovi, Australis, Hebdomadis, Bataviae, Autumnalis y Sejroe, producidos en el Laboratorio de Referencia Internacional de Leptospirosis del Instituto Tropical de Holanda. Como controles, se utilizaron las cepas de referencia Mus 127 y Arborea (Ballum), 5621 (Pomona), Hond Utrecht IV (Canicola), M20 (Icterohaemorrhagiae), Salinen (Pyrogenes), Perepelicin (Tarasovi), Ballico (Australis), Hebdomadis (Hebdomadis), Van Tiene (Bataviae), Akiyami A (Autumnalis) y Hardjoprajitno (Sejroe). Todas estas cepas forman parte de la colección INPPAZ/OPS, donada al Instituto Finlay por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Además se utilizaron un panel de cuatro anticuerpos monoclonales (AcM F74C1-6, AcM F74C4-4, AcM F74C7-3 y AcM F74C12-1), producidos por el Laboratorio de Referencia Internacional de Leptospirosis del Instituto de Medicina Tropical de Holanda.

### **III.a.9. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de la frecuencia de los signos clínicos y las lesiones anatomopatológicas observadas, se realizó la estimación puntual y se calcularon los intervalos de confianza por el método de aproximación de proporciones de Wilson.

La comparación de proporciones según el método exacto de Fisher de dos colas, se utilizó para analizar los resultados de las evaluaciones serológicas en el ensayo de inmunogenicidad, así como para determinar diferencias significativas en el porcentaje de sobrevida entre los animales inmunizados y el grupo control negativo en los ensayos de

protección activa y pasiva. Se analizó, además, mediante la prueba de correlación de Spearman, la existencia de una posible correlación entre los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos por cada preparación vacunal monovalente y la protección en hámsteres frente al reto homólogo y heterólogo (Mood A y cols., 1978).

La prueba de chi-cuadrado para la tendencia se usó para evaluar las diferencias significativas en los niveles de protección entre los grupos de hámsteres inmunizados con las diferentes diluciones del suero en los ensayos de protección pasiva.

Todos los valores de p fueron de doble cola, considerándose un valor de significación de 0,05 para indicar la significación estadística. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó EpiInfo 6.04d (Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades, CDC de Atlanta) y el Software GraphPad.

Para el análisis de sobrevida se utilizó el estimador de la función de sobrevida de Kaplan-Meier. Las curvas de sobrevida de Kaplan-Meier representan el porcentaje de sobrevida en todo el período de observación

### **III.1. Selección inicial de las cepas candidatas vacunales**

La selección de las cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum se basó en los resultados de la clasificación, es decir, que pertenecieran al serogrupo Ballum y mostraran su alta virulencia en el modelo animal Hámster Sirio.

#### **III.1.1. Clasificación serológica**

Todas las cepas clínicas se clasificaron hasta serogrupos mediante la técnica de MAT (Cole J y cols., 1973), empleando antisueros policlonales de referencia específicos para los 11 serogrupos circulantes en humanos en Cuba (Rodríguez I y cols., 2002). La MAT se realizó con la utilización de antígeno vivo y la incorporación de las respectivas cepas homólogas de referencia como controles de aglutinación para cada antisuero.

### **III.1.2. Evaluación cualitativa de la virulencia**

Se realizó a partir de los aislamientos pertenecientes al serogrupo Ballum, según la metodología descrita por González y cols. (2002a). Se inocularon por vía IP, grupos de cinco animales, con dosis de 0,8; 0,4; 0,1 y 0,05 mL de una suspensión bacteriana ajustada a  $7,5 \times 10^6$  células/mL (conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser), proveniente de un cultivo estático de 5-6 días en el medio proteico EMJH. Los animales inoculados se observaron durante un periodo de 14 días después de la inoculación.

Como criterio de aceptación de este ensayo, las cepas se consideraron altamente virulentas si produjeron la muerte de todos los animales inoculados con dosis  $\leq 0,1$  mL de la suspensión bacteriana. Si se produjo la muerte de los animales inoculados sólo con dosis  $\geq 0,4$  mL la cepa se consideró de moderada virulencia, para menores niveles de letalidad las cepas se clasificaron como de baja virulencia o avirulentas.

### **III.1.3. Cinética del crecimiento de las cepas seleccionadas**

Se evaluó la cinética de crecimiento de cada una de las cepas seleccionadas en el medio proteico EMJH, bajo las condiciones de cultivo estático (30°C) y agitado (130 r.p.m., 30°C) y en cada una de las tres variantes del medio libre de proteínas utilizadas en la producción del Instituto Finlay (PNO, 2002), también bajo cultivo agitado. Cada evaluación se realizó por triplicado y se incorporó como control del crecimiento la cepa vacunal 87, perteneciente al serogrupo Canicola.

Para el análisis del crecimiento en EMJH bajo condiciones estáticas se emplearon tubos de cristal con tapón de algodón conteniendo 30 mL de medio fresco inoculado al 10%. Se utilizó como inóculo un cultivo joven crecido en el mismo medio y bajo las mismas condiciones del ensayo (EMJH estático, 30°C), con buenas características (motilidad y uniformidad celular). Para el análisis del crecimiento en EMJH y medio libre de proteínas bajo condiciones de agitación se emplearon erlenmeyers con capacidad de 500 mL y tapón de algodón conteniendo 100 mL de medio fresco inoculado al 10%. Se utilizó como inóculo en todos los casos un cultivo joven crecido en EMJH bajo las mismas condiciones del ensayo (130 r.p.m., 30°C) con buenas características.

Se determinó la curva de crecimiento en cada caso, tomando muestras de los cultivos cada 24 h durante siete días. La concentración microbiana de cada muestra se midió por espectrofotometría ( $\lambda = 400 \text{ nm}$ ) y conteo directo de las células en una cámara de Petroff-Hausser. En cada muestreo se evaluaron las características de los cultivos (motilidad y uniformidad celular), por observación en el microscopio de campo oscuro; además, se realizaron controles de pureza a los cultivos mediante la tinción de Gram y siembra en caldo Triptona Soya y caldo Tioglicolato. Se analizaron los parámetros del crecimiento microbiano como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu = \ln(N-N_0)/(t-t_0)$ ) y el tiempo de duplicación ( $T_d = \ln 2/\mu$ ) (Madigan M y cols., 1999).

#### **III.1.4. Evaluación de la patogenia de la enfermedad en hámsteres**

Se inocularon en total 20 hámsteres por vía IP con 1 mL de cultivo, en fase exponencial, de cada una de las cepas y con una concentración celular de  $7,5 \times 10^6$  leptospira/mL (10 animales por cepa), evaluándose los signos de la enfermedad y mortalidad durante 14 días. Se consideró como criterio de aceptación que las cepas desarrollaran la infección leptospirósica o se lograra 100% de mortalidad en este período (González A y cols., 2002a). La observación clínica y los estudios anatomopatológicos se realizaron como se describe en el acápite III.a.2.

#### **III.1.5. Determinación de la dosis letal media**

La determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de cada cepa seleccionada, en el biomodelo Hámsters Sirio, se realizó, según la metodología propuesta por Fajardo y cols. (1998). A partir de un cultivo en fase exponencial, crecido en el medio proteico EMJH, bajo condiciones de cultivo agitado, se preparó una suspensión bacteriana con una concentración celular equivalente a 10-12 leptospiras por rango de observación en un microscopio de campo oscuro, para lo cual se diluyó el cultivo en el medio EMJH fresco. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas en el mismo medio de cultivo desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ . Posteriormente, se inocularon grupos de cinco animales con 0,5 mL de cada dilución por vía IP para cada cepa. Los animales se observaron durante 14 días y se registraron las muertes. El cálculo de la  $DL_{50}$  se realizó mediante el método de Reed y

Muench (Reed L y Muench H, 1938). Como controles negativos se utilizaron animales inoculados con el medio líquido EMJH, realizándose tres determinaciones sucesivas.

### **III.1.6. Identificación de los perfiles antigénicos celulares y extracelulares**

Todas las cepas bacterianas se cultivaron hasta finalizar la fase exponencial del crecimiento y para la identificación de los antígenos proteicos celulares, las células se colectaron por centrifugación a 10 000 g durante 10 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (TFS) pH 7,2 para eliminar las trazas de albúminas y proteínas del sobrenadante. Muestras de  $8 \times 10^9$  células se solubilizaron con 100 mL de una solución de lisis (62,5 mM Tris-HCl pH: 6,8; 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 2% SDS) y calentaron durante 10 min a 100° C. Las muestras así tratadas se mantuvieron toda la noche a 4°C y luego se separaron mediante electroforesis unidimensional en un gel de poliacrilamida y dodecil-sulfato de sodio (SDS-PSGE), empleando un gel separador al 12,5% (Brown J y cols., 1991).

Para la identificación de las proteínas secretadas al medio extracelular, los sobrenadantes libres de células y detritos celulares de todos los cultivos bacterianos se obtuvieron por al menos tres centrifugaciones sucesivas a 15 000 g durante 30 min. Muestras de 80 mL de cada sobrenadante se trataron con 20 mL de una solución de lisis concentrada 5x, calentada durante 10 min a 100°C y separadas mediante SDS-PAGE (12,5%).

Luego de la separación de las proteínas, los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie y se analizaron mediante un analizador de imágenes (ImageMaster VDS, Pharmacia). En todas las corridas electroforéticas se incluyó un patrón de peso molecular comercial (LMW Marker Kit, Pharmacia) para el análisis de los geles.

Los perfiles antigénicos obtenidos se compararon con los de las cepas vacunales 87, 169 y 108 pertenecientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente.

### **III.2. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga y heteróloga de preparados vacunales monovalentes de serogrupo Ballum**

Para este estudio se utilizó la metodología empleada en la vacuna trivalente vax-SPIRAL® (Instituto Finlay, 1998), con ligeras modificaciones. Después de obtener el crecimiento de las cepas de *Leptospira* serogrupo Ballum, virulentas, en el medio EMJH hasta el final de la fase exponencial, los cultivos se inactivaron químicamente mediante la exposición a Formalina (0,5%) durante 20 min. Las células se colectaron por centrifugación a 10 000 g durante 30 min y se lavaron al menos tres veces con TFS pH 7,2 estéril para resuspenderlas en TFS hasta una concentración de  $6 \times 10^8$  células/mL. Las células inactivadas y lavadas se adsorbieron en un gel de Hidróxido de Aluminio estéril mediante agitación lenta durante toda la noche, adicionándole Tiomersal como preservante a la formulación final. La composición por dosis (0,5 mL) de la vacuna monovalente fue la siguiente:  $1,5-2,4 \times 10^8$  células enteras inactivadas, 1 mg gel de Hidróxido de Aluminio y 0,05 mg de Tiomersal. Durante el proceso de formulación se realizaron los controles para la liberación satisfactoria de los lotes, establecidos por la Vicepresidencia de Calidad del Instituto Finlay, en las especificaciones (ESPE-01-007 y ESPE-02-042). Los preparados vacunales monovalentes con resultados satisfactorios en todos los controles realizados, se envasaron asépticamente y se conservaron a 4°C hasta su uso.

Para la evaluación de la inmunogenicidad se inmunizaron dos grupos de 10 animales con una u otra preparación vacunal monovalente, según se describe en el acápite III.a.5. Se tomaron muestras de sangre (III.a.6) previo a la primera dosis y luego semanalmente hasta los 21 días después de la segunda dosis. Se utilizaron como controles 10 animales no inmunizados, a los cuales se les realizó simultáneamente las mismas extracciones de sangre.

Se determinaron mediante la técnica de MAT, los niveles de aglutininas específicas alcanzados a los 14 días de la segunda dosis vacunal, empleando como antígenos la cepa utilizada para la elaboración de cada variante de la vacuna monovalente.

La respuesta de anticuerpos IgG específica inducida, por cada preparación vacunal frente al antígeno homólogo y a otros cuatro antígenos no incluidos en la formulación, se evaluó mediante un sistema ELISA indirecto cuantitativo (González A., 2003a). En cada caso se utilizó como antígeno a las células completas inactivadas y lavadas de las cepas 42600, 12399, 87, 169 y 108. Las placas de 96-pozos (COSTAR®, Corning, Estados Unidos) se sensibilizaron con 100 µL de un antígeno ajustado a  $2 \times 10^8$  células/mL y desecada durante 16 h a 50°C. Las células no adsorbidas se eliminaron mediante lavados con agua destilada y 0,05% (v/v) de Tween 20. El bloqueo se realizó con leche descremada al 3% (v/v) en TFS durante 1 h a 37°C. Las muestras de sueros y los controles a evaluar se diluyeron 1:200 en TFS con 3% de leche descremada y 0,05% de Tween 20. Las placas se incubaron a 37°C por 2 h. Se utilizó como conjugado proteína A-peroxidasa (Sigma, EUA) diluido 1:15 000 en el mismo medio de las muestras, el cual se incubó durante 1 h a 37°C. El revelado se realizó, adicionando la mezcla sustrato-cromógeno de Peróxido de Hidrógeno 0,03%-OPD 1 mg/mL y el tampón Fosfato Citrato pH 5,5. La reacción se detuvo a los 20 min de incubación a temperatura entre 20-25°C y las absorbancias se midieron en un lector de placas (Teteryek-Muktiskan®, Joint Venture, Finlandia) a una longitud de onda de 492 nm. Seguido de cada paso de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con solución de lavado (agua destilada, 0,05% (v/v) Tween 20).

Los valores de absorbancia se transformaron en U/mL, según la curva de calibración obtenida con un suero estándar (100 U/mL), preparado previamente a partir de la mezcla de 10 sueros de hámsteres con títulos de aglutininas  $\geq 1/256$ , frente a los cuatro antígenos, según la técnica de MAT. Como criterio de seroconversión se consideró el incremento, en al menos cuatro veces, de la concentración de IgG específica en la semana siete (una semana después de completar el esquema de inmunización), en comparación con la misma, previo a la primera dosis vacunal ( $T_7/T_0 \geq 4$ ).

Para la evaluación de la capacidad de protección homóloga y heteróloga de las preparaciones vacunales se inmunizaron dos grupos de 110 animales con una u otra preparación vacunal monovalente, según lo descrito en III.a.5. El reto se realizó, siguiendo la metodología del acápite III.a.7 contra aproximadamente 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de cada una

de las cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum y de las cepas vacunales 87, 169 y 108. Como control de inocuidad de las vacunas se tomó un grupo de 10 animales inmunizados con cada preparación monovalente y no retados. Los animales inoculados se observaron durante 14 días posteriores al reto, desarrollando la metodología descrita en III.a.2, y III.a.3. La DL<sub>50</sub> de cada una 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.

### **III.3. Evaluación del efecto de una inmunización con una dosis de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>**

Se inmunizaron 20 animales con vax-SPIRAL<sup>®</sup> (lote 0031), según se describe en III.a.5. Tras seis semanas de concluido el esquema de inmunización, 10 hámsteres recibieron, por la misma vía de administración, una dosis adicional de 0,5 mL de vacuna monovalente de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum cepa 12399, mientras los restantes 10 animales se utilizaron como controles no reinmunizados. Un grupo control adicional de 10 hámsteres no recibió ninguna de las dos vacunas y se empleó como control no inmunizado.

Se tomaron muestras de sangre, siguiendo las recomendaciones que se describen en el acápite III.a.6, previo a la primera inmunización y en las semanas 2, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 14 y 15. Las muestras se evaluaron mediante un sistema ELISA indirecto cuantitativo (González A, 2003a) y se midió la respuesta de anticuerpos IgG específica inducida luego de cada dosis vacunal, frente a los cuatro antígenos empleados en la inmunización, utilizando la metodología del acápite III.2.2.

### **III.4. Evaluación de la inmunidad cruzada en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>**

Para la evaluación de la protección cruzada se utilizaron 110 hámsteres inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> (lote 7001). Un grupo de 40 animales recibió una sola dosis, mientras que el resto (70) recibió dos (acápites III.a.5). Tras completar ambos esquemas, se retaron los animales del primer grupo y 40 hámsteres del segundo (según III.a.7) con aproximadamente 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de cada una de las cepas seleccionadas del serogrupo Ballum. Los 30 animales restantes del segundo grupo se utilizaron como control

de potencia de la vacuna trivalente y se retaron, en grupos de 10, con aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de cada cepa vacunal. Como controles del ensayo se utilizaron 40 animales no inmunizados.

Paralelamente se vacunaron 60 hámsteres con una dosis de vax-SPIRAL<sup>®</sup>, (lote 7001), diluida 1/2, 1/4 y 1/8 (20 animales por dilución). Los animales inmunizados se retaron con 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas seleccionadas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum (12399 y 42600).

En todos los casos se evaluó la protección conferida contra la infección letal y la prevalencia de leptospiras en los órganos, según se describe en el acápite III.a.3.

### **III.5. Inmunización pasiva**

Se inmunizaron 40 hámsteres con la vacuna vax-SPIRAL<sup>®</sup> (lote 8027X), según lo descrito en el acápite III.a.5. Tras 14 días de concluido el esquema de inmunización, los animales se sacrificaron para la obtención de suero (III.a.6), los cuales se mezclaron (1 mL de cada uno). Por otro lado, se partió de una mezcla de sueros de individuos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> (lote 9009), que participaron en un ensayo clínico realizado en el Instituto Finlay (González M y cols., 2001). El suero de estos individuos se obtuvo 14 días después de concluido el esquema de vacunación.

Ambas mezclas de sueros, por separado, se filtraron por un Minisart 0,45 µm (Sartorius) y se conservaron a -20°C hasta su utilización. Los niveles de anticuerpos aglutinantes específicos de estas mezclas se evaluaron mediante la técnica de MAT (Cole J y cols., 1973), utilizando el panel de cepas de referencia, recomendado por la OPS. Como controles negativos se utilizaron: un suero de hámster sano no inmunizado y un suero de un individuo sano donado por un banco de sangre. Ambos sueros se evaluaron previamente por la MAT, con este mismo panel de cepas de referencia, siendo no reactivos para ninguna de las cepas.

Finalmente, se realizaron diluciones seriadas de estas mezclas (puro, 1/2, 1/4 y 1/8) y se inocularon 160 hámsteres por vía intraperitoneal con 1 mL de cada mezcla de sueros (20 x dilución x variante de mezcla). Transcurridas 12 h de administrado el suero, los animales de cada dilución se retaron por vía IP contra aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de cada una de las cepas virulentas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum (12399 y 42600). Se emplearon 10 animales, por cepa de reto y 0,5 mL como volumen de inóculo. Los hámsteres se observaron durante 14 días y se registraron las muertes. Como controles del estudio se utilizaron 160 animales, 80 inmunizados con el suero negativo de hámster y humano, respectivamente.

Paralelamente se inmunizaron 150 hámsteres con vacunas monovalentes del serogrupo Ballum (12399 y 42600) (75 animales por variante), según III.a.5. Después de 14 días de concluido el esquema de inmunización, los animales se sacrificaron para la obtención del suero (III.a.6). Los 75 sueros de cada variante se mezclaron (1mL de cada uno) y se filtraron por Minisart 0,45µm (Sartorius).

A continuación se siguió la misma metodología descrita en el acápite III.5.1. En este estudio se inocularon 100 hámsteres (50 x cada mezcla de suero, según la variante monovalente) y como cepas de reto se utilizaron las cepas seleccionadas (12399 y 42600) y las cepas vacunales. Se utilizaron 50 hámsteres con el suero control negativo.

### **III.6. Identificación de los serogrupos componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup> que confieren protección cruzada a *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum**

Se formularon preparaciones vacunales monovalentes a partir de cada cepa vacunal presente en vax-SPIRAL<sup>®</sup> (Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona) y de cada cepa seleccionada (12399 y 42600), siguiendo la metodología utilizada en III.2.1.

Cinco grupos de 40 animales se inmunizaron, con cada una de las preparaciones vacunales monovalentes, respectivamente, según lo descrito en el acápite III.a.5. Tras 21 días de completado el esquema de inmunización, los hámsteres se retaron con aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de cada cepa heteróloga. Como controles del estudio se

utilizaron 50 animales no inmunizados y retados, en grupos de 10, con cada cepa de reto. La dosis letal media de cada una de las cepas utilizadas en el reto se corroboró 15 días antes del ensayo y se repitió de forma paralela al mismo con el objetivo de asegurar las dosis empleadas. A continuación se siguió la misma metodología para la determinación de la prevalencia de *Leptospira* en los principales órganos diana, descrita en III.a.3.

### **III.7. Identificación de los antígenos de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum por el suero de hámsteres y humanos vacunados con vax-SPIRAL®**

Para la identificación de los antígenos de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum, por el suero de los vacunados se desarrolló un SDS-PAGE, siguiendo la misma metodología para la identificación de los perfiles antigénicos celulares (ver III.1.6). Las bandas separadas por SDS-PAGE se transfirieron durante 14-16 h, a 4° C, y una intensidad de corriente de 30 mA, a una membrana de nitrocelulosa (Hybond<sup>TM</sup>-C extra, EUA) (Burnette, 1980). La transferencia se realizó, utilizando como tampón (48 mM Tris pH 9.2, 39 mM glicina, 1,3 mM SDS y 20% metanol). Luego de bloquear la membrana con leche descremada (Merck, Alemania) al 5%, en Tris-Salina, la membrana se incubó a 37°C durante 2 h con suero de hámsteres o de humanos inmunizados con vax-SPIRAL®, diluido 1:20 en Tris-Salina con 5% de leche descremada y 0,05% (v/v) de Tween 20 (TSLT). Para la detección de las bandas se incubó 1 h a 37°C con un conjugado de proteína A-peroxidasa (Sigma, EUA) diluido 1:1000 en TSLT. El revelado se realizó con la solución sustrato que contenía 4-cloro-1-naftol (0,01 mg/mL) (Merck, Alemania) y Peróxido de Hidrógeno (0,015%, v/v) (Fluka, Suiza). Entre cada paso de incubación se realizaron cinco lavados de 5 min, con Tris-Salina y Tween 20 al 0,05% (v/v). Como control negativo se utilizó suero de hámsteres y humanos no inmunizados.

## IV. RESULTADOS

---

### IV.1. Selección de las cepas candidatas vacunales

#### IV.1.1. Clasificación serológica

La clasificación serológica realizada por la técnica de MAT en los 53 aislamientos clínicos de leptospiras permitió la identificación de cinco serogrupos (tabla 1), entre los 11 que circulan entre humanos en Cuba, según las notificaciones epidemiológicas más actualizadas (Rodríguez I y cols., 2002; Obregón A, 2007). Además, en la tabla 2 se muestran, para las cepas de Ballum, los títulos obtenidos por la técnica de MAT frente a los antisueros policlonales utilizados.

**Tabla 1. Clasificación serológica hasta serogrupo, mediante la técnica de MAT de 53 aislamientos clínicos de leptospiras procedentes de la provincia de Holguín.**

Serogrupos	Aislamientos (n)	%
Pomona	22	41
Ballum	18	34
Canicola	11	21
Icterohaemorrhagiae	1	2
Hebdomadis	1	2

#### IV.1.2. Evaluación cualitativa de la virulencia

Este ensayo permitió la división de las cepas obtenidas, de los 18 aislamientos pertenecientes al serogrupo Ballum, en tres categorías: alta, moderada y baja virulencia (tabla 2). Sólo dos aislamientos (cepas 42600 y 12399) mostraron una elevada virulencia en el modelo animal empleado, comportamiento que determinó su selección como cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum. El comportamiento de la mortalidad de los animales inoculados con las cepas seleccionadas se refleja en la figura 1. Como se puede observar, no hubo una disminución gradual de la sobrevida en función de la dosis aplicada,

según los coeficientes de correlación de Spearman para cada cepa ( $\delta_{12399} = -0,77$  y  $\delta_{42600} = -0,6$ ), aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,22$ ) (ver anexos).

**Tabla 2. Títulos de aglutininas mediante la técnica de MAT, utilizando antisueros policlonales y evaluación cualitativa de la virulencia de las cepas del serogrupo Ballum.**

No. de orden	Cepas (No.)	Título por MAT	Virulencia
3	92700	1/64	BV
7	104800	1/256	MV
8	105800	1/32	BV
9	91700	1/128	BV
10	98000	1/512	MV
13	101	1/64	BV
17	28800	1/320	MV
18	132400	1/64	BV
19	111599	1/512	BV
20	10099	1/256	BV
<b>23</b>	<b>12399</b>	<b>1/320</b>	<b>AV</b>
24	27299	1/32	MV
25	52900	1/512	BV
39	27000	1/128	BV
52	72100	1/64	MV
53	58000	1/128	BV
<b>56</b>	<b>42600</b>	<b>1/1024</b>	<b>AV</b>
57	63800	1/256	BV

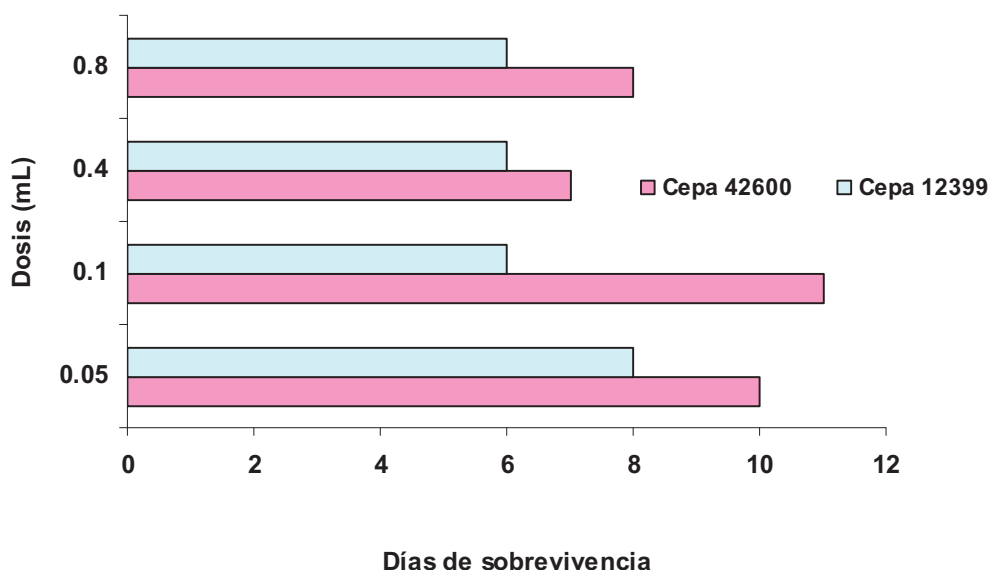
#### **Leyenda**

MAT: Ensayo de microaglutinación

AV: Altamente virulenta, MV: Medianamente virulenta, BV: baja virulencia

No.: Número de identificación de las cepas

En negritas las cepas seleccionadas.



**Figura 1. Resultados de la virulencia de las cepas 12399 y 42600 en el modelo animal Hámster Sirio. No se observaron diferencias significativas con la variación de la dosis ( $p > 0,22$ )**

El uso de un panel de cuatro anticuerpos monoclonales (AcM F74C1-6, AcM F74C4-4, AcM F74C7-3 y AcM F74C12-1), producidos por el Laboratorio de Referencia Internacional de Leptospirosis del Instituto de Medicina Tropical de Holanda, permitió descartar la ubicación de las cepas en tres de los seis serovares que conforman al serogrupo Ballum (Brenner D y cols., 1999). El tipaje con los AcMs permitió concluir que las cepas no pertenecen a los serovares: Kenya, Guangdong y Perú, pero éste fue insuficiente para definir la ubicación en uno de los tres serovares restantes: Arborea, Ballum y Castellonis. Estas cepas se enviaron al Laboratorio de Referencia de Holanda donde ratificaron la clasificación que se obtuvo en este trabajo, identificando las cepas dentro de los serovares Ballum y Arborea, con un título de 1/10 240 y 1/5 120, respectivamente (tabla 3).

**Tabla 3. Clasificación de las cepas por la técnica de MAT, utilizando los anticuerpos monoclonales de referencia.**

Cepas	Clasificación		
	Serogrupo	Serovar	Título por MAT frente a AcMs
12399	Ballum	Arbórea	1/5 120
42600	Ballum	Ballum	1/10 240

**Leyenda**

MAT: Ensayo de microaglutinación

AcMs: Anticuerpos Monoclonales

Los datos de las cepas del serogrupo Ballum seleccionadas como candidatas vacunales se relacionan en la tabla 4.

**Tabla 4. Cepas del serogrupo Ballum seleccionadas como candidatas vacunales.**

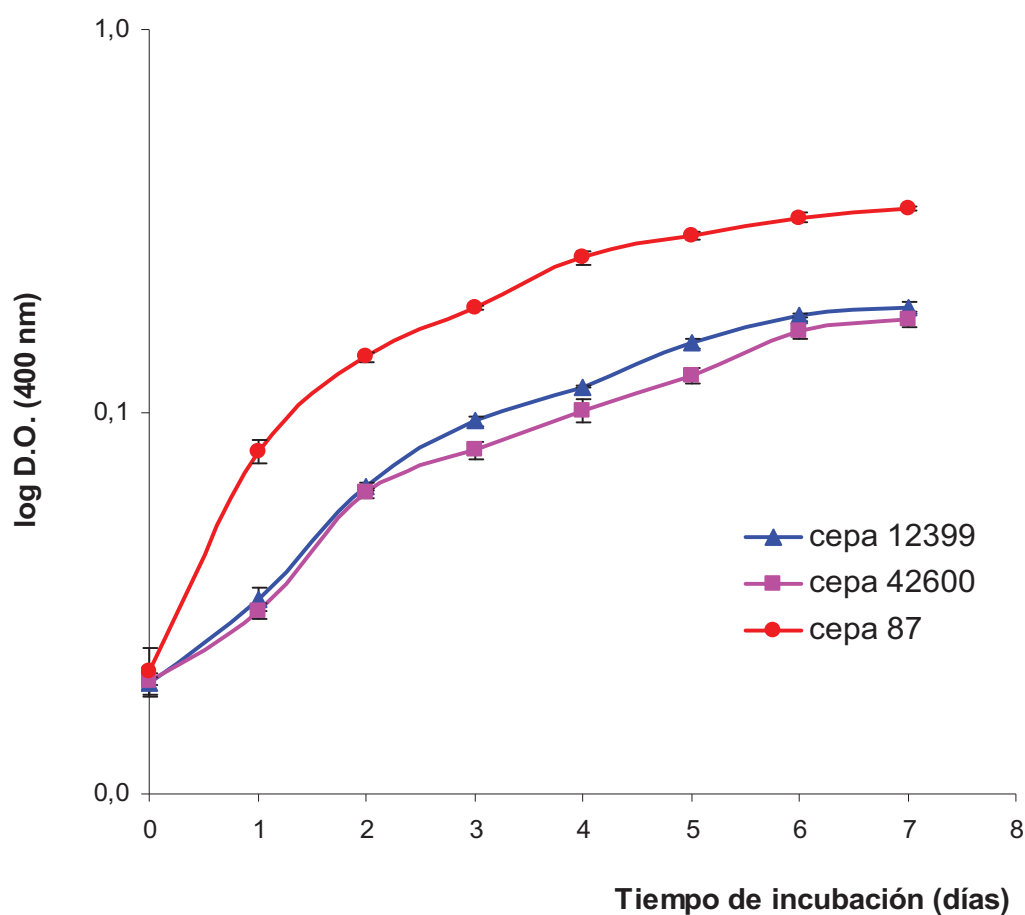
Cepa	Fecha de aislamiento	Muestra clínica	Procedencia
42600	24-5-2000	Sangre	CPHE Holguín
12399	18-8-1999	Sangre	CPHE Holguín

**Leyenda**

CPHE: Centro Provincial de Higiene y Epidemiología

#### **IV.1.3. Cinética del crecimiento de las cepas seleccionadas**

A partir de una concentración inicial aproximada de  $5 \times 10^7$  células/mL, ambas cepas del serogrupo Ballum alcanzaron la mitad de los rendimientos logrados por la cepa vacunal de Canicola ( $1,2 \times 10^9$  células/mL) en medio EMJH, una vez finalizada la fase exponencial del crecimiento bajo condiciones de cultivo estático (figura 2). Bajo estas condiciones de cultivo, las cepas de Ballum mostraron una velocidad específica de crecimiento menor ( $\mu_{12399} = 1,0' 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ,  $\mu_{42600} = 0,9' 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y un tiempo generacional superior ( $Td_{12399} = 69\text{h}$ ,  $Td_{42600} = 77\text{h}$ ) a los alcanzados por la cepa vacunal de Canicola ( $\mu_{87} = 1,2' 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ,  $Td_{87} = 58\text{h}$ ), ver tabla 5.



**Figura 2.** Curvas de crecimiento seguidas por las cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum (12399 y 42600) y la cepa vacunal del serogrupo Canicola (87) en el medio proteico EMJH bajo el cultivo con condiciones estáticas (30°C). Se tomaron muestras de los cultivos cada 24 h durante 7 días, la concentración celular se determinó por medición de la absorbancia a 400nm y conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser.

**Tabla 5. Parámetros de crecimiento evaluados en las cepas del serogrupo Ballum y Canicola durante el cultivo estático en medio proteico EMJH.**

Cepas	Parámetros de crecimiento					
	C <sub>0</sub> (cel/mL)	DO <sub>0</sub> (400nm)	C <sub>1</sub> (cel/mL)	DO <sub>1</sub> (400nm)	μ (h <sup>-1</sup> )	Td (h)
42600 (Ballum)	5×10 <sup>7</sup>	0,020 ± 0,001	6,3×10 <sup>8</sup> ± 0,3	0,175 ± 0,008	0,9×10 <sup>-2</sup>	77,0
12399 (Ballum)	5×10 <sup>7</sup>	0,020 ± 0,001	6,8×10 <sup>8</sup> ± 0,2	0,188 ± 0,006	1,0×10 <sup>-2</sup>	69,0
87 (Canicola)	5×10 <sup>7</sup>	0,021 ± 0,003	1,2×10 <sup>9</sup> ± 0,1	0,343 ± 0,003	1,2×10 <sup>-2</sup>	58,0

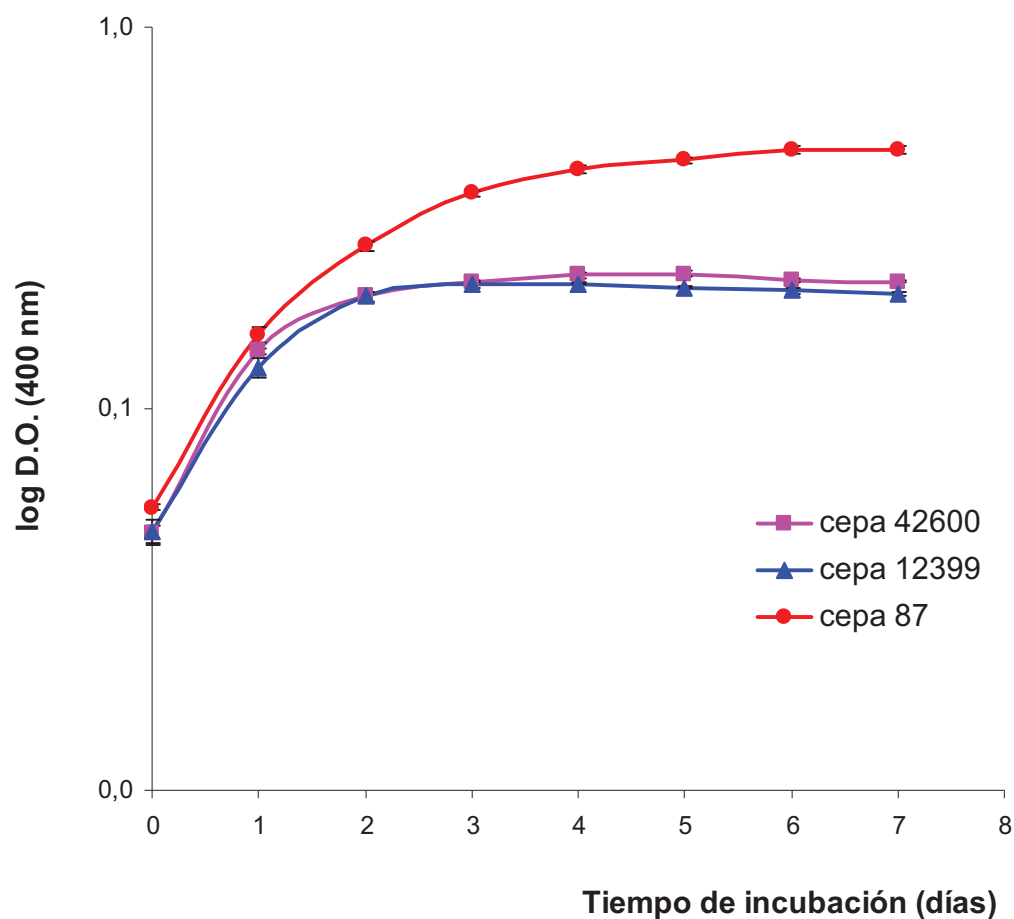
**Leyenda**

C<sub>0</sub>: Concentración celular inicial  
 DO<sub>0</sub>: Densidad óptica inicial  
 μ: Velocidad específica de crecimiento  
 C<sub>1</sub>: Concentración celular final  
 DO<sub>1</sub>: Densidad óptica final  
 Td: Tiempo de duplicación  
 Los valores de la tabla representan las medias de tres replicas del experimento

Resultados similares se observaron al evaluar la cinética de crecimiento de las tres cepas en medio EMJH bajo las condiciones de cultivo agitado, aunque los rendimientos logrados (en todos los casos) fueron superiores a los obtenidos bajo el cultivo estático. Mientras que, la cepa vacunal de Canicola alcanzó casi 2 x 10<sup>9</sup> células/mL, las dos cepas Ballum después de cuatro días de incubación, mostraron un rendimiento promedio de 7 x 10<sup>8</sup> células/mL (figura 3). Bajo estas condiciones de cultivo las tres cepas mostraron velocidades de crecimiento específicas ( $\mu_{12399} = 2,9 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ,  $\mu_{42600} = 2,9 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ,  $\mu_{87} = 3,0 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y tiempos de duplicación ( $Td_{12399} = 23,9\text{h}$ ,  $Td_{42600} = 23,9\text{h}$ ,  $Td_{87} = 22,8\text{h}$ ) muy similares (tabla 6), aunque la fase de crecimiento exponencial en las cepas de Ballum culminó más rápido (figura 3).

**Tabla 6. Parámetros de crecimiento evaluados en las cepas del serogrupo Ballum y Canicola durante el cultivo agitado en medio proteico EMJH.**

Cepas	Parámetros de crecimiento					
	C <sub>0</sub> (cel/mL)	DO <sub>0</sub> (400nm)	C <sub>1</sub> (cel/mL)	DO <sub>1</sub> (400nm)	μ (h <sup>-1</sup> )	Td (h)
42600 (Ballum)	9×10 <sup>7</sup>	0,048 ± 0,004	7,6×10 <sup>8</sup> ± 0,0	0,213 ± 0,001	2,9×10 <sup>-2</sup>	23,9
12399(Ballum)	9×10 <sup>7</sup>	0,047 ± 0,003	7,6×10 <sup>8</sup> ± 0,1	0,226 ± 0,004	2,9×10 <sup>-2</sup>	23,9
87(Canicola)	9×10 <sup>7</sup>	0,055 ± 0,001	1,7×10 <sup>9</sup> ± 0,4	0,478 ± 0,012	3,0×10 <sup>-2</sup>	22,8



**Figura 3. Curvas de crecimiento seguidas por las cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum (12399 y 42600) y la cepa vacunal del serogrupo Canicola (87) en el medio proteico EMJH bajo el cultivo con condiciones agitadas (30°C y 130rpm). Se tomaron muestras de los cultivos cada 24 h durante 7 días, la concentración celular se determinó por medición de la absorbancia a 400nm y conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser.**

Un aspecto de particular interés fue el mejoramiento de las características de los cultivos de las cepas seleccionadas después de varios subcultivos sucesivos en el medio EMJH bajo condiciones de crecimiento agitado. Características como la motilidad, la uniformidad celular e incluso los rendimientos finales mejoraron luego de varios subcultivos semanales bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación empleadas en este estudio.

Ninguna de las tres variantes de medio libre de proteínas analizadas logró sustentar siquiera un discreto crecimiento de las dos cepas del serogrupo Ballum. Después de 24 h de incubación los cultivos mostraron un marcado efecto citolítico con una mortalidad generalizada y la presencia de abundantes detritos. A diferencia de lo observado con la cepa de Canicola donde se obtuvieron resultados satisfactorios (anexos)

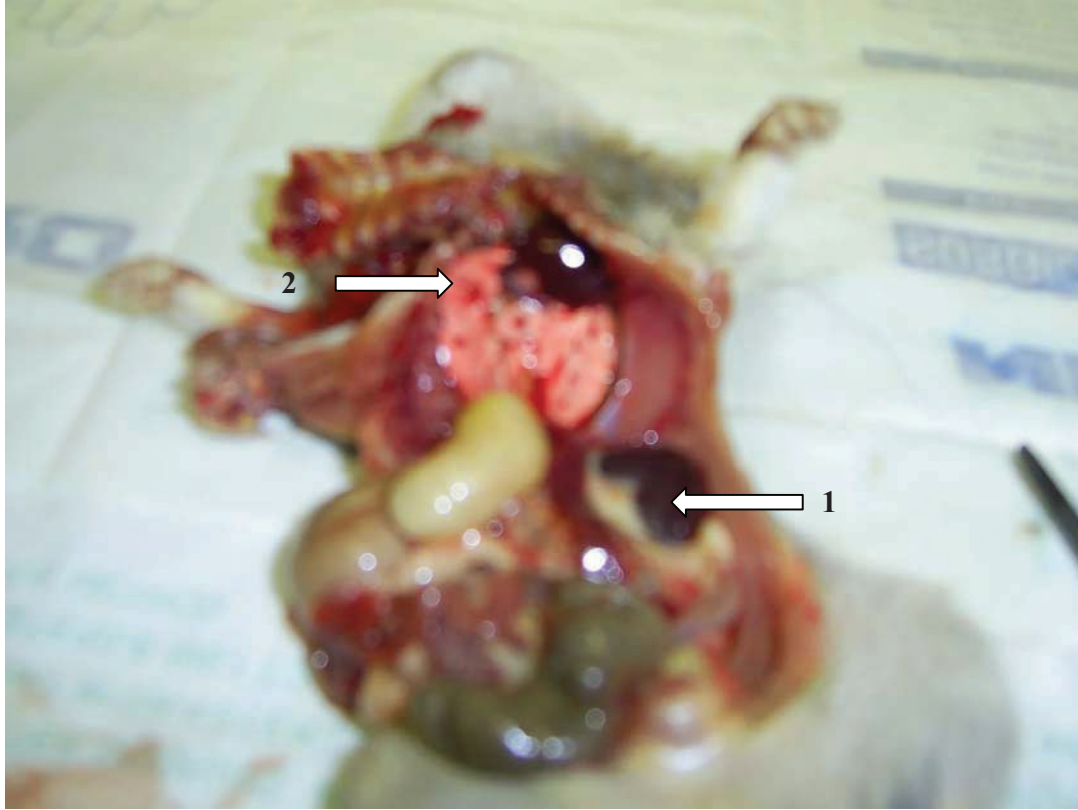
#### **IV.1.4. Evaluación de la patogenia de la enfermedad en hámsteres**

Las dos cepas fueron patógenas, ya que mostraron un cuadro clínico caracterizado por: piloerección, excitabilidad, signos nerviosos, hemorragias por los orificios nasales y postración. Se observó también: íctero, congestión grave en todos los órganos y hemorragias pulmonares focales, entre otros. Las manifestaciones clínicas fueron evidentes, características de una infección experimental. Además, causaron la muerte del 100% de los animales entre el tercer y décimo día posteriores a la infección (figuras 4 y 5).

Se pudo observar que los signos clínicos estudiados entre las diferentes cepas evaluadas mostraron una frecuencia de aparición variable (tabla 7). La piloerección fue un signo clínico generalizado para las dos cepas. Ambas cepas se comportaron de forma icterica en el biomodelo animal. Para ambas cepas se encontraron evidencias de la ocurrencia de hemorragias a través de los orificios nasales.



**Figura 4. Hámsteres infectados con leptospirosis serogrupo Ballum mostrando signos de alteraciones nerviosas, hemorragias por los orificios nasales y muerte.**



**Figura 5. Hámsteres infectados con leptospiras serogrupo Ballum mostrando íctero (flechas 2 y 3). y hemorragias pulmonares focales (flecha 1).**

**Tabla 7. Signos clínicos observados en los animales retados con las diferentes cepas de *Leptospira* virulentas.**

Cepas Ballum	SIGNOS CLÍNICOS					
	n(%) (IC)					
	Piloerección	Excitabilidad	Ictero de piel y mucosas	Hemorragias en orificios nasales	Postración	Muerte
12399	10(100) (72,2-100)	8(80) (49,0-94,3)	9(90) (59,6-99,5)	5(50) (23,7-76,3)	10(100) (72,2-100)	10(100) (72,2-100)
42600	10(100) (72,2-100)	7(70) (39,7-89,2)	10(100) (72,2-100)	8(80) (49,0-94,3)	10(100) (72,2-100)	10(100) (72,2-100)

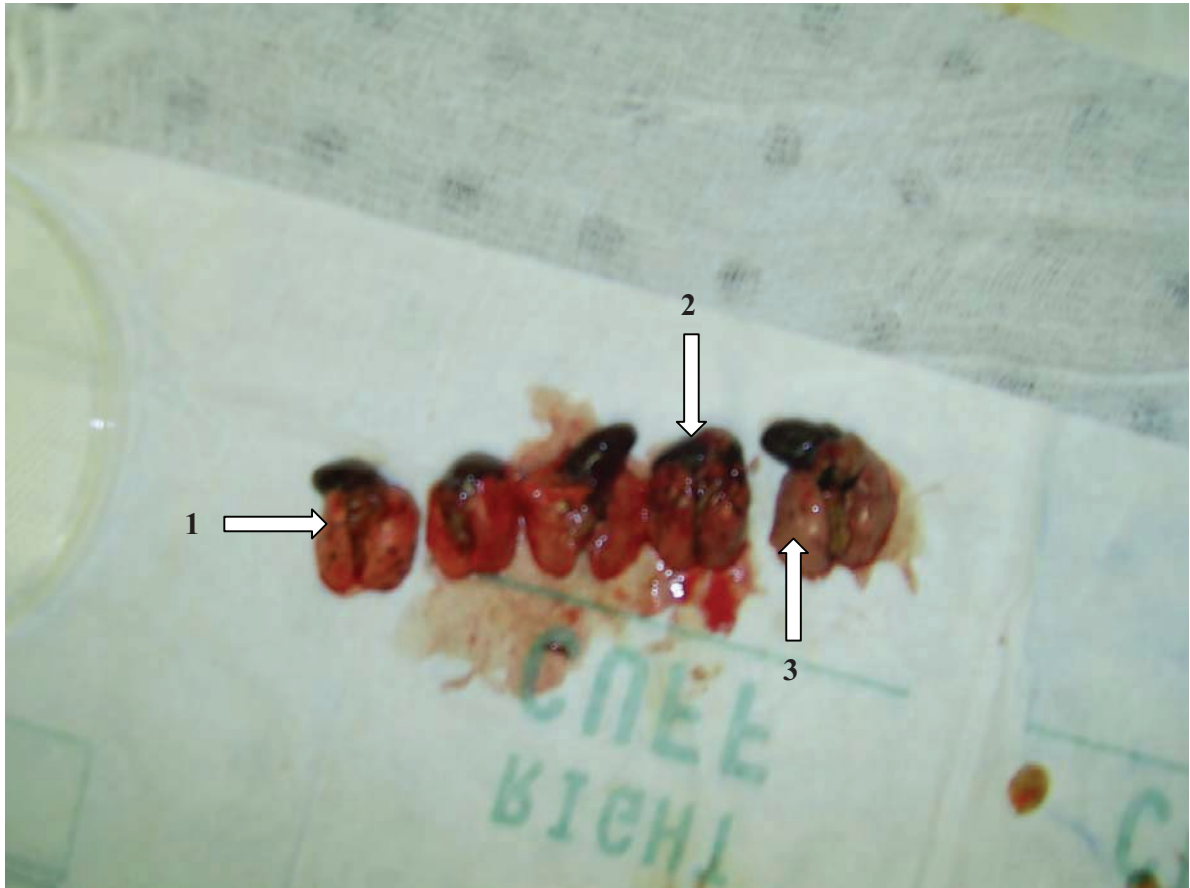
**Leyenda**

IC: intervalo de confianza para  $p=0,05$

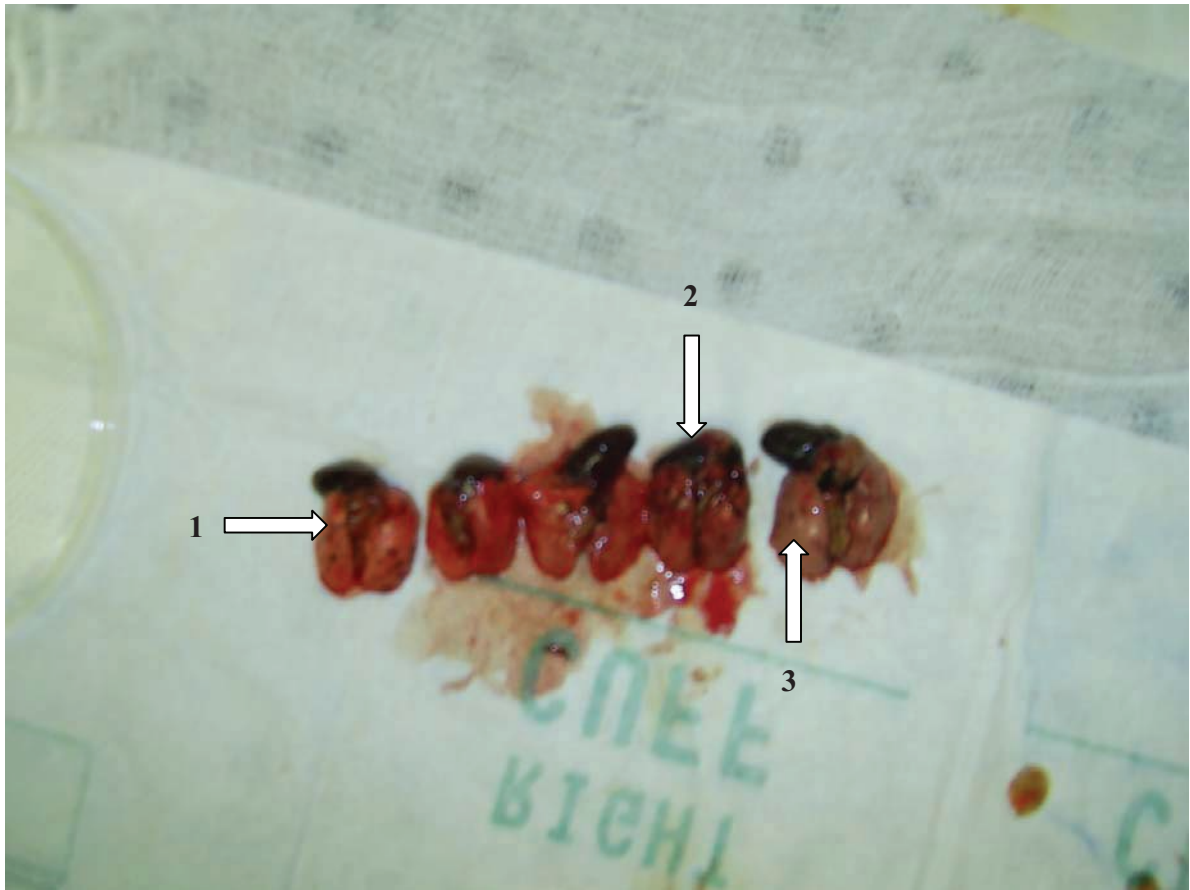
Desde el punto de vista anatomopatológico macroscópico se observaron evidencias inequívocas del establecimiento de la enfermedad, así como de graves daños en las vísceras y los órganos. Las cepas produjeron, sobre todo, focos de hemorragias en el riñón y los pulmones (figura 6 y 7). De forma similar ocurrió una congestión hepática y renal, y con menos frecuencia hemorragia renal.

Histológicamente, el hígado, el riñón y los pulmones fueron los órganos más afectados. El hígado se caracterizó por una grave congestión y desorganización de los cordones de hepatocitos, con focos hemorrágicos y necróticos en los estados más avanzados. En los riñones se observó una degeneración grave del epitelio tubular, las hemorragias y los depósitos proteinaceos a nivel de los glomérulos y túmulos (figura 8). Mientras que, los pulmones se caracterizaron por la presencia de enfisemas, congestiones y hemorragias graves, unido a la presencia de polimorfonucleares neutrófilos en los septos alveolares.

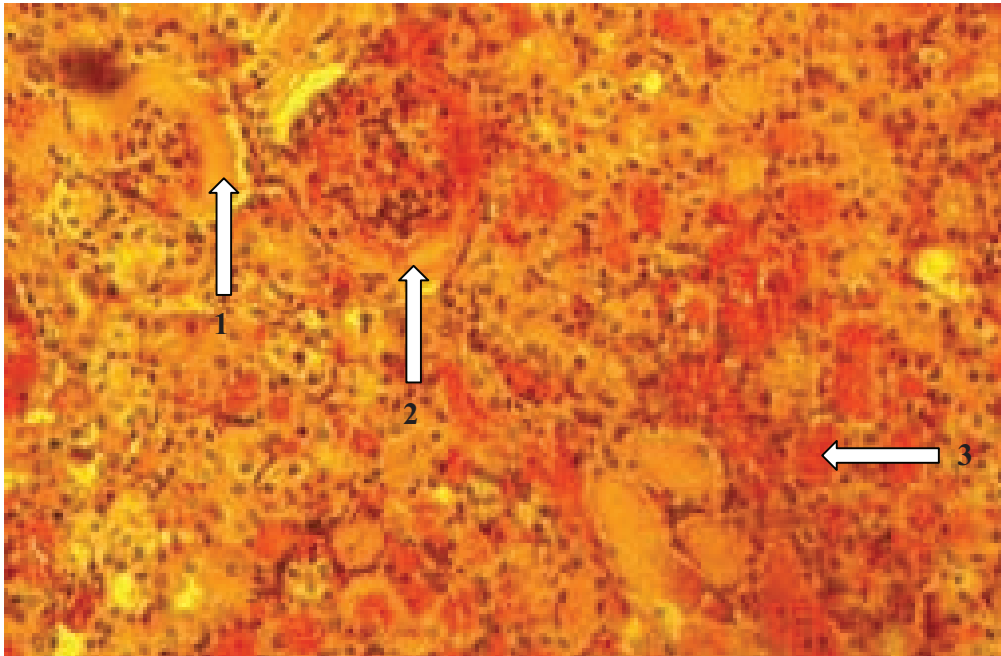
La presencia de leptospiras en la totalidad de los órganos investigados por la técnica argéntica de Warthyn Starryn fue una evidencia inequívoca de la circulación e invasividad de las espiroquetas en los animales infectados (figura 9). Otros órganos que presentaron lesiones fueron el corazón, con hemorragias e infartos agudos graves y el SNC, que se



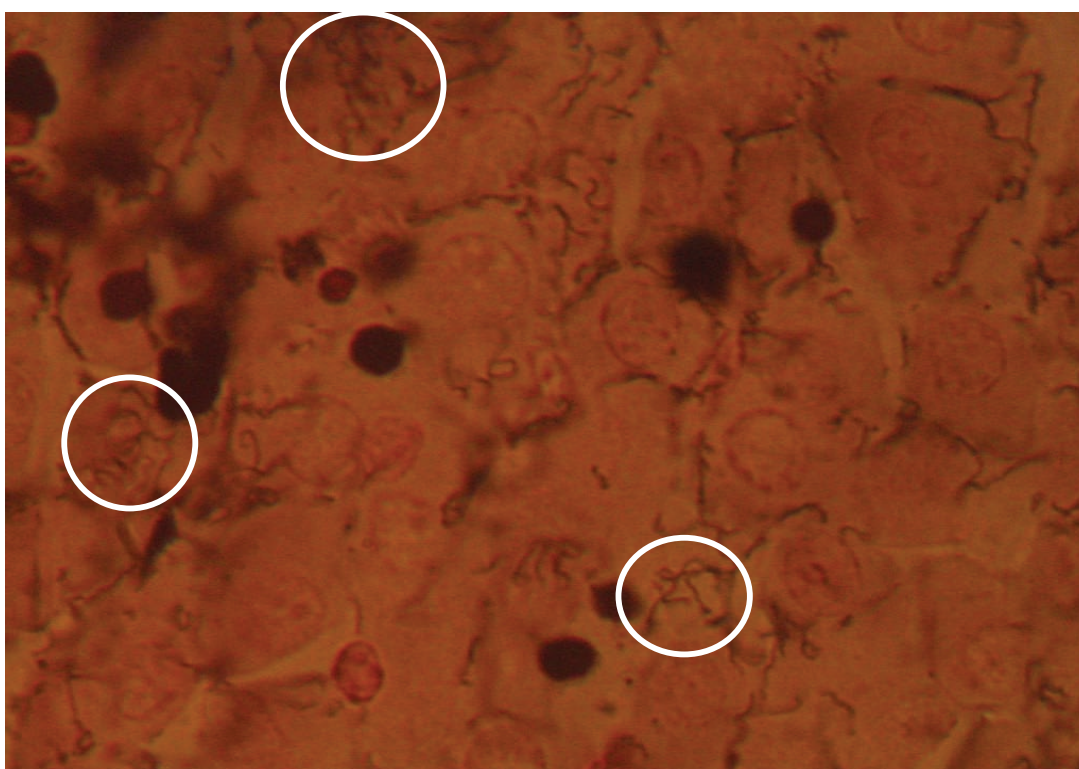
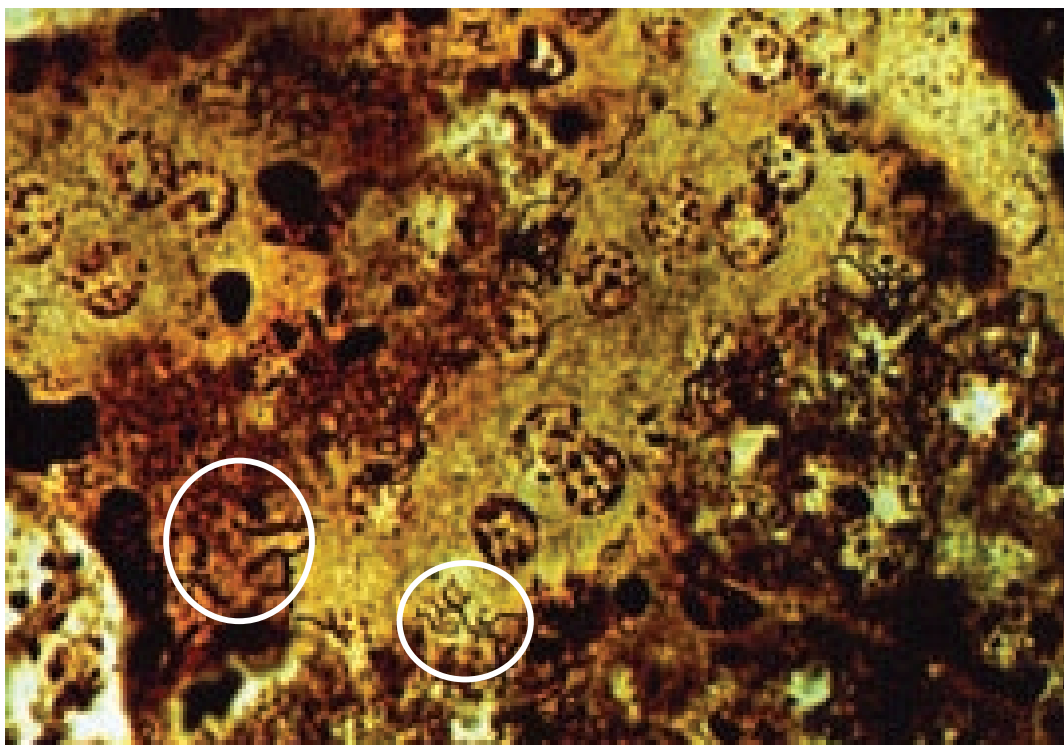
**Figura 6. Corazón y pulmones de hámsteres infectados con el serogrupo Ballum, mostrando congestión grave del corazón (flecha 2) y los pulmones con enfisema (flecha 3) y focos hemorrágicos (flecha 1).**



**Figura 7. Hámster infectado con leptospira serogrupo Ballum, mostrando una grave congestión renal (flecha 1) y focos hemorrágicos en los pulmones (flecha 2).**



**Figura 8. Corte histopatológico de riñón, mostrando una grave congestión, degeneración del epitelio tubular, hemorragias (flecha 3) y depósitos proteínicos en los glomerulos (flechas 1 y 2). HE x 120.**



**Figura 9. Corte histopatológico de riñón, mostrando conglomerados de leptospiras en los túmulos (círculos). Tinción especial de Warthyn Starryn x 260.**

observó congestivo al nivel de los vasos meníngeos. Por otra parte, en el bazo se destacó la congestión de los cordones de Billrock y el depósito de hemosiderina libre y fagocitada.

#### IV.1.5. Determinación de la dosis letal media

Los resultados de la evaluación cuantitativa de la virulencia de las cepas seleccionadas mediante la determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), mostraron una DL<sub>50</sub>=9 células para la cepa 12399, mientras que para la cepa 42600 fue de DL<sub>50</sub>=8.1 células. Resultados similares se obtuvieron después de realizar tres determinaciones sucesivas. Este ensayo mostró, de manera general, poca variabilidad entre ensayos para una misma cepa, lo que se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8. Valores de la DL<sub>50</sub> obtenidos para cada cepa en el estudio**

Cepas	Valores de DL <sub>50</sub> de los ensayos individuales (células)			Valores promedios de DL <sub>50</sub> (SD)
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
12399	9,3	8,2	9,5	9,0 (0,7)
42600	8,5	8,3	7,5	8,1(0,5)

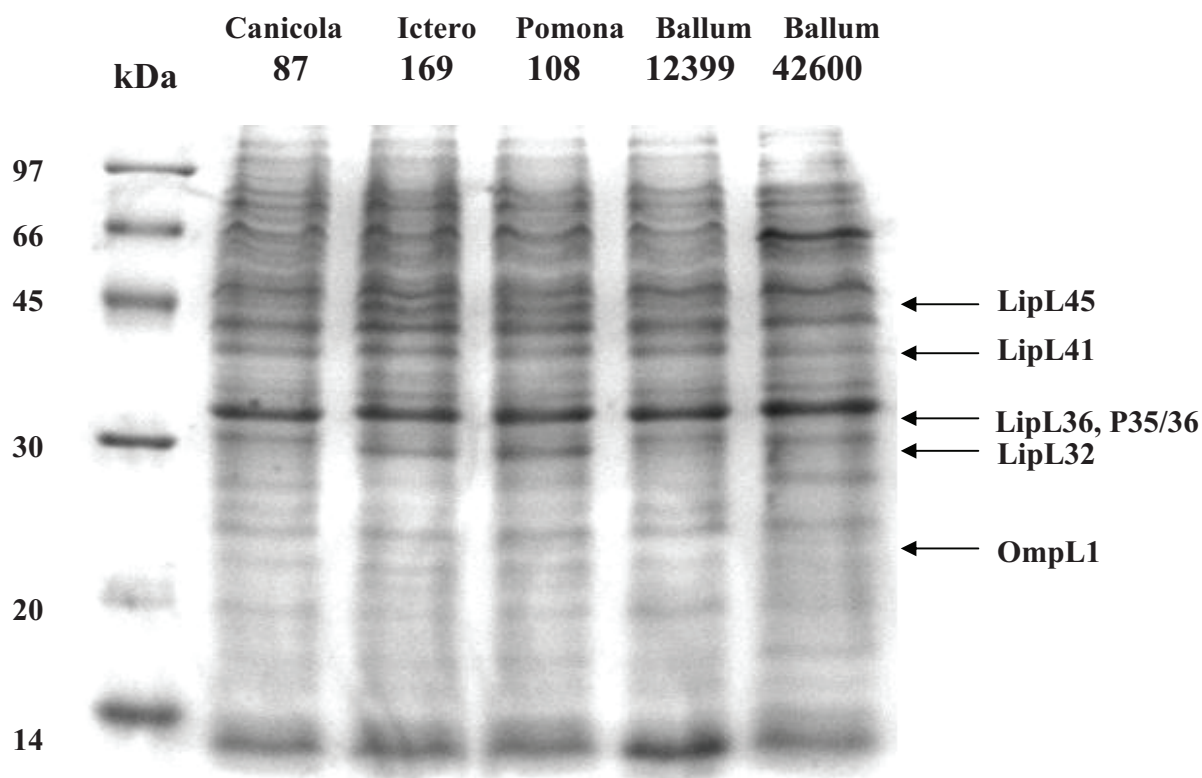
#### Leyenda

SD: Desviación estándar

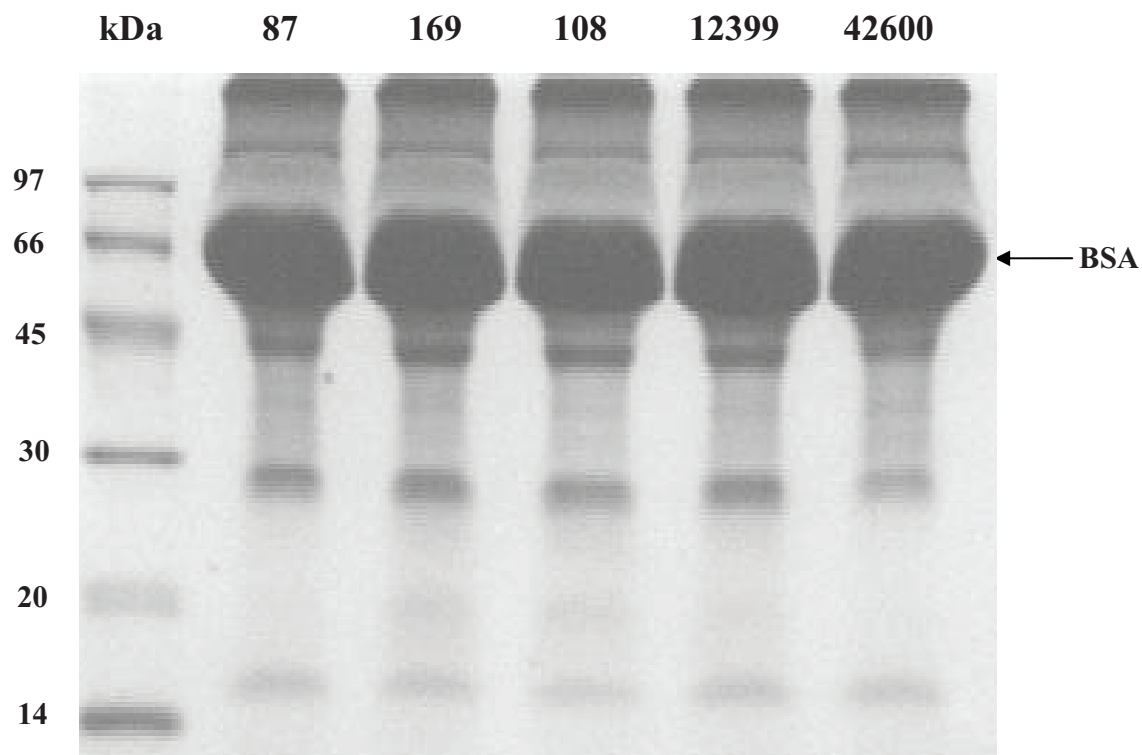
#### IV.1.6. Identificación de los perfiles antigénicos celulares y extracelulares

El análisis de los lisados de las células completas mediante SDS-PAGE unidimensional en un gel de poliacrilamida al 12,5%, permitió identificar la expresión de 19 bandas antigénicas comunes para ambas cepas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum, con pesos moleculares de 12, 13, 15, 16, 19, 25, 29, 32, 36, 39, 41, 45, 48, 54, 64, 71, 82, 89 y 95 kDa. Estas bandas antigénicas se identificaron también en las cepas correspondientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona (figura 10).

El análisis de los sobrenadantes libres de células reveló la expresión común de al menos siete bandas antigénicas definidas con pesos moleculares de 15, 20, 30, 35, 41, 47 y 158 kDa (figura 11). Se observó en todos los casos una distorsión en el patrón de bandas entre los 60 y 70 kDa.



**Figura 10.** Análisis mediante SDS-PAGE unidimensional (gel separador al 12.5% y tinción con azul brillante de Coomassie) del lisado de células completas de las cepas 87 (Canicola), 169 (Icterohaemorrhagiae), 108 (Pomona), 12399 (Ballum) y 42600 (Ballum) crecidas en el medio EMJH bajo condiciones controladas (130 rpm, 30°C) hasta finales de la fase exponencial (4 días). Las flechas a la derecha indican la posible ubicación de algunas de las proteínas altamente conservadas de *Leptospira* descritas en la literatura: las lipoproteínas LipL32, LipL36, LipL41 y LipL45; la porina OmpL1 y las proteínas flagelares de 35 y 36 kDa.



**Figura 11.** Análisis mediante SDS-PAGE (gel separador al 12.5% y tinción con azul brillante de Coomassie) de sobrenadantes libres de células de las cepas 87 (*Canicola*), 169 (*Icterohaemorrhagiae*), 108 (*Pomona*), 12399 (*Ballum*) y 42600 (*Ballum*) crecidas en el medio EMJH bajo un cultivo con condiciones controladas (130 rpm, 30°C) hasta finales de la fase exponencial. La flecha a la derecha indica la ubicación de la albúmina sérica bovina (BSA), componente del medio de cultivo, que provoca distorsión del patrón de bandas dada su elevada concentración.

#### **IV.2. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga y heteróloga de preparados vacunales monovalentes del serogrupo Ballum**

Los títulos de aglutininas específicas inducido en los hámsteres por cada preparación vacunal monovalente frente a sus respectivos antígenos homólogos, 14 días después de completar el esquema de inmunización, alcanzaron valores  $\geq 1:256$ ; mientras que los títulos previos a la primera dosis vacunal fueron menores que 1:4, para las dos cepas, al igual que en los animales controles no inmunizados.

La evaluación mediante ELISA de la respuesta IgG específica inducida por ambas preparaciones monovalentes frente al antígeno homólogo reveló una seroconversión significativa ( $T_7/T_0 \geq 4$ ) frente a cualquiera de los dos antígenos del serogrupo Ballum. Ambas vacunas indujeron un incremento significativo de la actividad IgG específica a uno u otro antígeno de Ballum posterior a la primera y segunda dosis ( $p < 0,05$ ), aunque la respuesta homóloga inducida por el inmunógeno 12399 (figura 12) fue superior a la lograda por el antígeno 42600 (figura 13). Los porcentajes de seroconversión logrados por ambas preparaciones frente a los serogrupos heterólogos fueron bajos, aunque ligeramente superiores a *Canicola* en comparación con *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona* (figura 12 y 13).

Al evaluar la capacidad de protección homóloga y heteróloga de cada preparación vacunal monovalente frente al reto con aproximadamente 100 y 10 000  $DL_{50}$  de cada cepa seleccionada y de las cepas vacunales (serogrupos *Canicola*, *Ictero* y *Pomona*), se apreció que ambas preparaciones confirieron un alto grado de protección contra la infección letal con las dos cepas del serogrupo homólogo, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para cualquiera de las dosis de reto empleadas. La protección cruzada frente a los serogrupos heterólogos fue parcial y en algunos casos nula. Sólo se apreció una protección cruzada estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con la preparación del antígeno 12399 frente al reto con 100  $DL_{50}$  del serogrupo *Canicola* (figura. 14).

Los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos por cada preparación vacunal monovalente de Ballum, así como los resultados de sobrevivencia logrados frente al reto homólogo y heterólogo, se compararon mediante el Test Exacto de Fisher de dos colas, sin

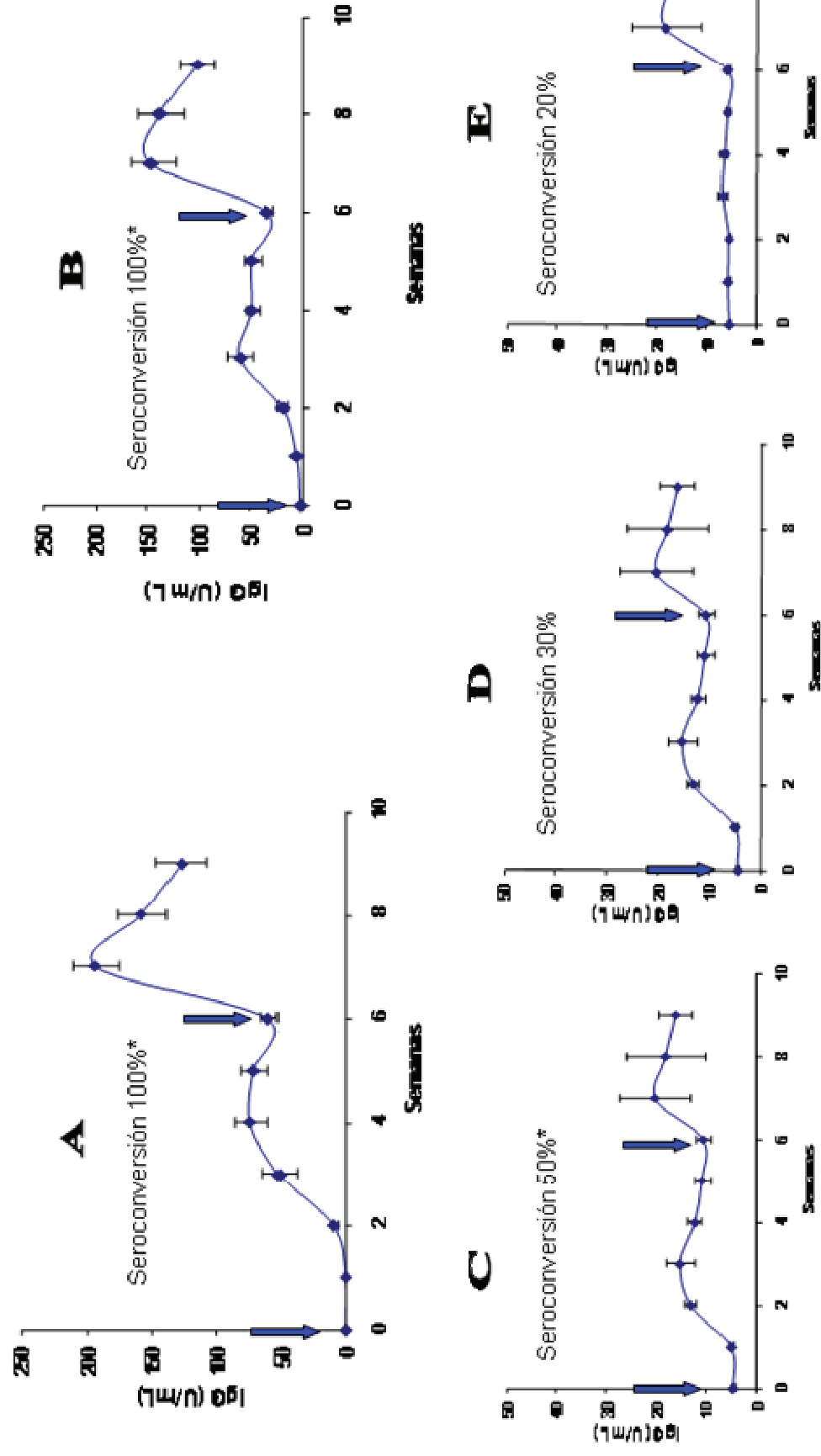


Figura 12. Respuesta IgG específica inducida en los hámsteres tras la inmunización con dos dosis (0,5 mL) por vía intramuscular de la preparación vacunal monovalente de Ballum (antígeno 12399), evaluada mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras y utilizando para el recubrimiento las cepas 12399 (A) y 42600 (B), 87 de Canicola (C), 169 de Icterohaemorrhagiae (D) y 108 de Pomona (E). Las flechas indican el momento de aplicación de ambas dosis de vacuna y las gráficas muestran el resultado de la mezcla del suero de 10 animales. Los asteriscos denotan diferencias significativas en la protección ( $p < 0,05$ ) respecto a los controles no inmunizados.

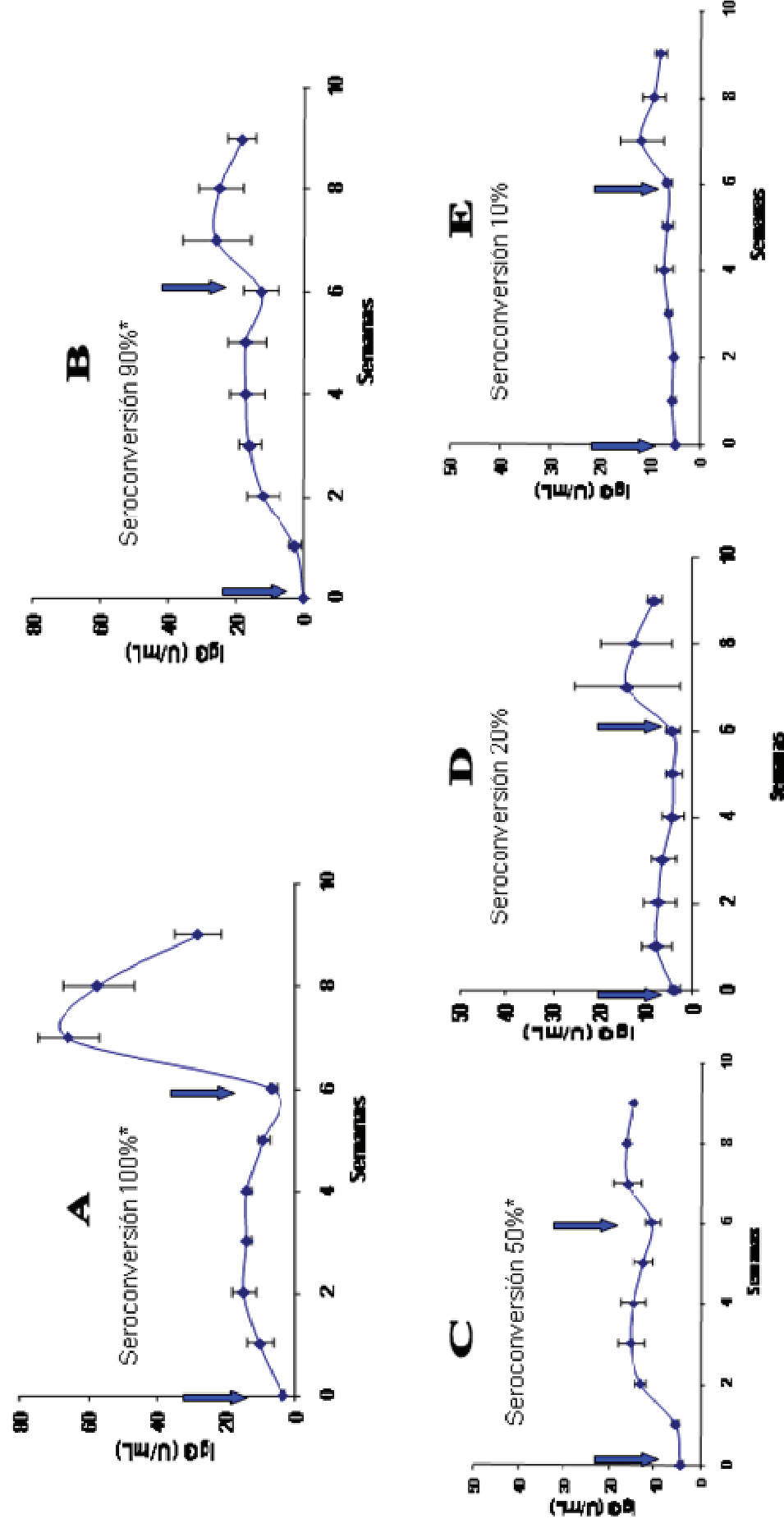


Figura 13. Respuesta IgG específica inducida en los hámsteres tras la inmunización con dos dosis (0,5 mL) por vía intramuscular de la preparación vacunal monovalente de Ballum (antígeno 42600), evaluada mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras y utilizando para el recubrimiento las cepas 42600 (A) y 12399 (B), 87 de Canicola (C), 169 de Icterohaemorrhagiae (D) y 108 de Pomona (E). Las flechas indican el momento de aplicación de ambas dosis de vacuna y las gráficas muestran el resultado de la mezcla del suero de 10 animales. Los asteriscos denotan diferencias significativas en la seroconversión ( $p < 0,05$ ) respecto a los controles no inmunizados.

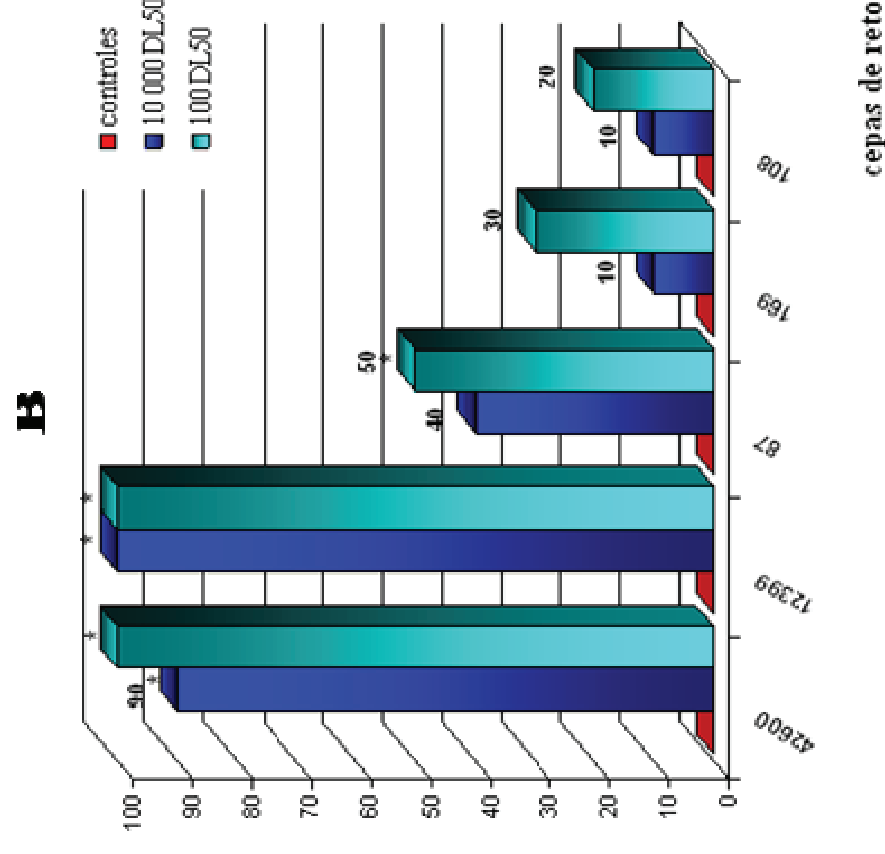
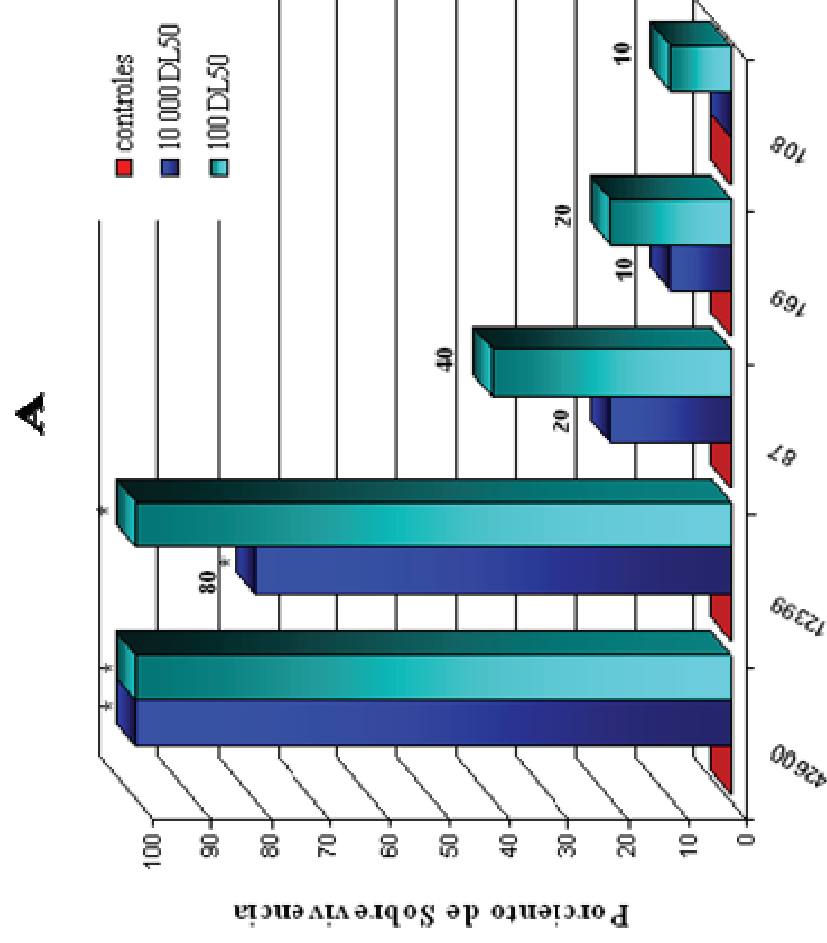


Figura 14. Protección contra la infección letal conferida en los hámsters por las preparaciones vacunales monovalentes de *Ballum* tras el reto con 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas 42600 (Ballum), 12399 (Ballum), 87 (Canicola), 169 (Icterohaemorrhagiae) y 108 (Pomona) a los 14 días de aplicada la segunda dosis. (A) Preparación vacunal monovalente con antígeno 42600. (B) Preparación vacunal monovalente con antígeno 12399. Fueron aplicadas dos dosis (0,5mL), por vía intramuscular, de vacuna monovalente con un intervalo de seis semanas. Los asteriscos denotan diferencias significativas en la protección ( $p < 0,05$ ) respecto a los controles no inmunizados.

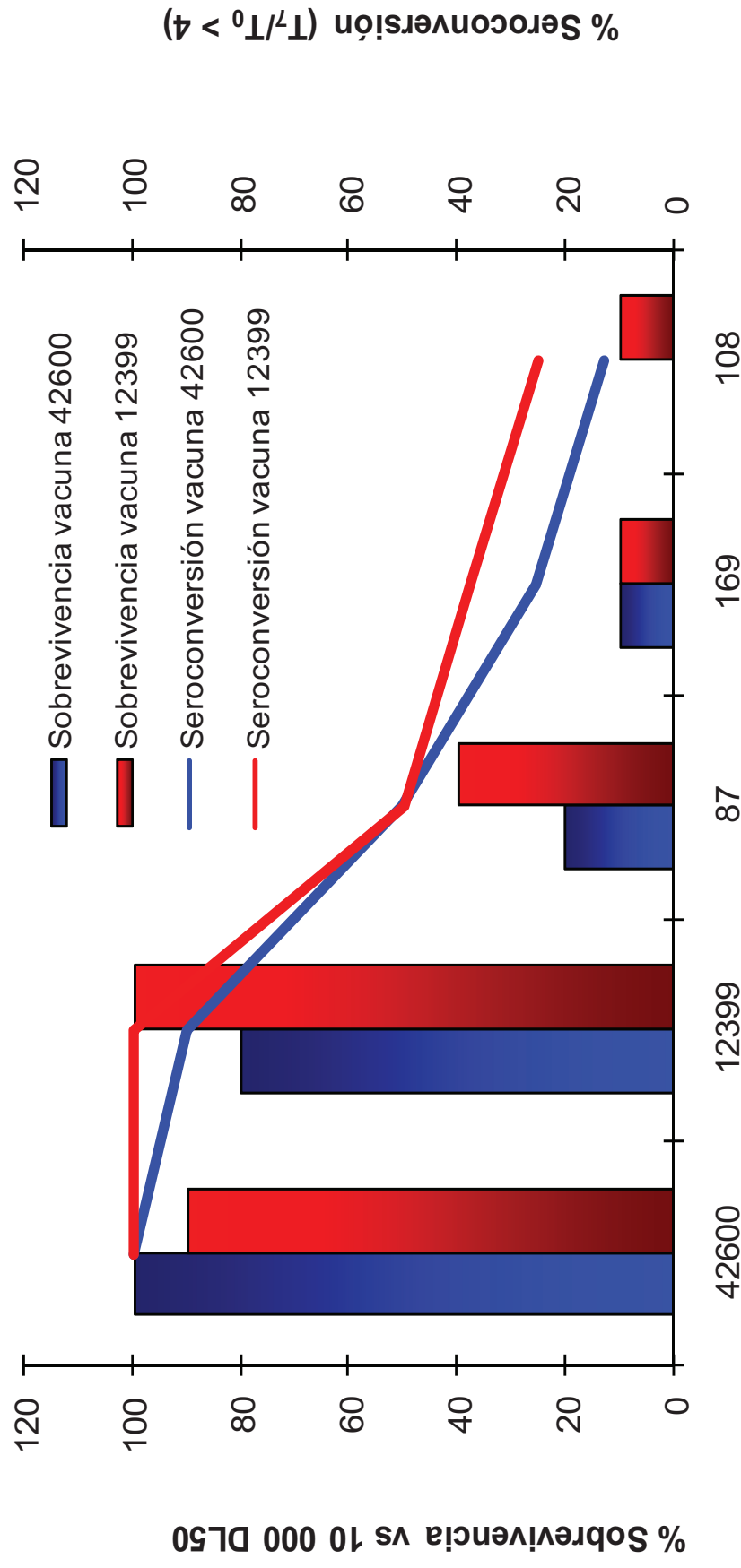
existir diferencias significativas en estos parámetros entre las preparaciones vacunales ( $p > 0,47$ ). Ambos preparados vacunales fueron inmunogénicos y confirieron una protección significativa contra Ballum.

El análisis macroscópico de los órganos en los animales inmunizados sobrevivientes al reto, reveló en todos los casos, la ausencia de signos característicos de infección (endurecimiento, hemorragias o ictericia). Después de 60 días de incubación, el cultivo de varias secciones de los órganos en el medio EMJH no mostró crecimiento microbiano. Para cualquiera de las dos preparaciones monovalentes de Ballum evaluadas, se obtuvieron resultados similares en los sobrevivientes del reto homólogo y heterólogo. De esta forma, ambas preparaciones vacunales evitaron el establecimiento del estado de portador en todos los casos en que se registró protección contra la infección letal.

Asimismo, se comprobó para ambas preparaciones vacunales monovalentes, la existencia de una correlación entre los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos y la protección frente al reto, con 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas utilizadas en el ensayo (figura 15), según la Prueba de Correlación de Spearman ( $\delta_{12399} = 0,947$ ,  $p_{12399} = 0,014$  y  $\delta_{42600} = 1$ ,  $p_{42600} = 0.0$ ) y de Pearson ( $\delta p_{12399} = 0,992$ , y  $\delta p_{42600} = 0.945$ ).

#### **IV.3. Evaluación del efecto de una inmunización con una dosis de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>**

Al evaluar la respuesta IgG específica a Ballum inducida por la inmunización con vax-SPIRAL<sup>®</sup> se apreció un 100% de seroconversión ( $T/T_0 \geq 4$ ), incluso posterior a la primera dosis de vacuna trivalente (Tabla 9).



### Cepas de reto/antígenos de ELISA

Figura 15. Correlación entre los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos en la población animal vacunada y la protección contra la infección letal frente al reto con 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas 42600 (Ballum), 12399 (Ballum), 87 (Canicola), 169 (Icterohaemorrhagiae) y 108 (Pomona) ( $\delta_{12399}=0,947$ ,  $p_{12399}=0,014$  y  $\delta_{42600}=1$ ,  $p_{42600}=0$  ).

**Tabla 9. Concentración de anticuerpos IgG específicos al serogrupo Ballum inducidos en hámsteres después de la inmunización con vax-SPIRAL®.**

Tiempo (semana)	Concentración de IgG (U/mL) por animal										Media	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
T <sub>0</sub>	2,467	2, 589	1,455	1,918	2,494	2,535	2,104	1,876	1,539	2,003	2,245	0,203
T <sub>1</sub>	23,14	49,00	8,42	25,29	19,97	41,14	38,45	30,76	14,98	16,78	27,828	6,611
T <sub>4</sub>	38,37	38,17	58,47	11,34	33,59	23,57	41,78	35,67	50,03	47,63	33,920	7,093
T <sub>7</sub>	58,55	112,67	119,73	32,01	34,82	30,15	44,54	43,39	59,48	54,28	59,488	13,677

#### **Leyenda**

T<sub>0</sub>: antes de la aplicación de la primera dosis

T<sub>1</sub>: dos semanas después de aplicada la primera dosis

T<sub>4</sub>: una semanas después de aplicada la segunda dosis (semana 7)

T<sub>7</sub>: una semana después de aplicado el búster con Ballum (semana 13)

Transcurridas seis semanas después de aplicar la primera dosis vacunal, se observó una disminución ligera de los niveles de IgG específicos; pero éstos se incrementaron después de aplicar la segunda dosis, sobrepasando ligeramente el nivel máximo alcanzado después de la primera inmunización (figura 16A).

La aplicación de una dosis de la vacuna monovalente de Ballum, seis semanas después de completar el esquema con vax-SPIRAL®, indujo un rápido y significativo incremento de la actividad IgG específica a Ballum (figura 16A). Este típico efecto de respuesta humoral de memoria tras la primera dosis con Ballum, logró un incremento de los niveles de IgG específica significativamente superior a aquellos logrados con una o dos dosis de antígenos heterólogos incluidos en vax-SPIRAL®. Esta inmunización heteróloga con Ballum indujo, además, un rápido y significativo incremento de la respuesta IgG específica a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, aunque la magnitud de esta respuesta heteróloga fue inferior a la lograda con dos dosis de inmunógeno homólogo.

La inmunización con la cepa de Ballum en los animales vacunados con vax-SPIRAL® no sólo indujo un efecto búster sobre la inmunidad cruzada a este serogrupo ya establecida

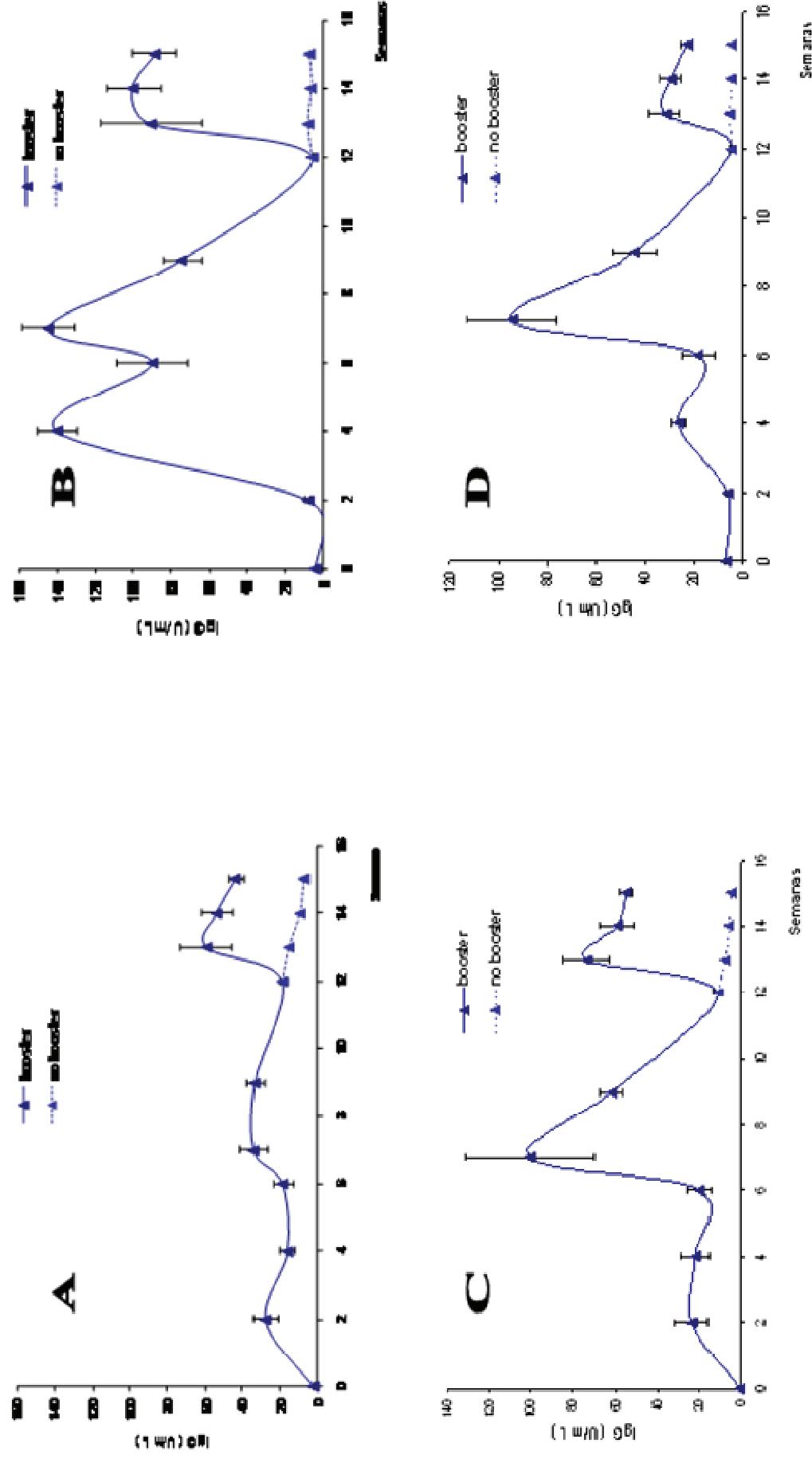


Figura 16. Respuesta IgG específica inducida en hámsters tras la inmunización con dos dosis (0,5 mL) de vax-SPIRAL<sup>®</sup> y una tercera dosis de preparación monovalente de Ballum (antígeno 12399), evaluada mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras y utilizando para el recubrimiento las cepas 12399 de Ballum (A), 87 de Canicola (B), 169 de Icterohaemorrhagiae (C) y 108 de Pomona (D). Las flechas indican el momento de aplicación de las tres dosis vacunales.

por la vacuna trivalente, sino que también potencializó la respuesta humoral a los tres serogrupos vacunales (figura 16B, C, D).

#### IV.4. Evaluación de la inmunidad cruzada en los hámsteres vacunados con vax-SPIRAL®

Al evaluar la protección cruzada conferida por una dosis de vax-SPIRAL® frente al serogrupo Ballum, se apreció un 100% de protección en los animales inmunizados frente a la infección letal y al estado de portador, independientemente de la cepa de Ballum utilizada y de la dosis de reto aplicada. Todos los animales inmunizados con la vacuna trivalente y retados con Ballum, sobrevivieron al reto heterólogo con aproximadamente 100 ó 10 000 DL<sub>50</sub> de ambas cepas utilizadas en el estudio (tabla 10). Igual resultado se obtuvo al evaluar la protección cruzada conferida por dos dosis frente al reto con Ballum (tabla 11).

Al evaluar la protección cruzada conferida por las diferentes diluciones de una dosis de vax-SPIRAL® frente a Ballum, se apreció que todos los animales sobrevivieron al reto heterólogo con ambas cepas de Ballum utilizadas (tabla 12).

En los ensayos realizados, para ninguno de los animales que sobrevivieron al reto, se observaron síntomas característicos de infección en los órganos diana (hígado y riñón), ni crecimiento de leptospiras en los cultivos de los órganos realizados.

**Tabla 10. Resultados del reto de hámsteres vacunados con una dosis de vax-SPIRAL® (Lote 7001), frente a aproximadamente 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas virulentas seleccionadas (12399 y 42600).**

No. de DL <sub>50</sub>	Cepa de reto	Vacunados n = 10	No vacunados n = 10
		%S	%S
100	12399	100*	0
	42600	100*	0
10 000	12399	100*	0
	42600	100*	0

##### Leyenda

%S: Porcentaje de sobrevivencia

\* diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre los animales inmunizados y sus controles

**Tabla 11. Resultados del reto en hámsteres vacunados con dos dosis de vax-SPIRAL<sup>®</sup>, (Lote 7001), frente a aproximadamente 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas virulentas seleccionadas (12399 y 42600) y a 10 000 DL<sub>50</sub> de los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok.**

No. de DL <sub>50</sub>	Cepa de reto	Vacunados n = 10	No vacunados n = 10
		%S	%S
100	12399	100*	0
	42600	100*	0
	12399	100*	0
	42600	100*	0
10 000	Canicola	100*	0
	Copenhageni	100*	0
	Mozdok	100*	0

**Leyenda**

%S: Porcentaje de sobrevivencia

\* diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre los animales inmunizados y sus controles

**Tabla 12. Resultados del reto de hámsteres vacunados con las diferentes diluciones de una única dosis de vax-SPIRAL<sup>®</sup> (Lote 7001), frente a aproximadamente 100 y 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas virulentas seleccionadas de Ballum (12399 y 42600).**

Dilución de la vacuna	DL <sub>50</sub>	Cepa de reto	Vacunados n = 10	No vacunados n = 10
			%S	%S
1/2	100	12399	100*	0
		42600	100*	0
	10 000	12399	100*	0
		42600	100*	0
1/4	100	12399	100*	0
		42600	100*	0
	10 000	12399	100*	0
		42600	100*	0
1/8	100	12399	100*	0
		42600	100*	0
	10 000	12399	100*	0
		42600	100*	0

**Leyenda**

%S: Porcentaje de sobrevivencia

\* diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre los animales inmunizados y sus controles

#### IV.5. Inmunización pasiva

Al estimar los niveles de aglutininas específicas, mediante la técnica de MAT, inducidos en la mezcla de los sueros procedentes de hámsteres inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, se alcanzaron títulos de 1/128, 1/64, 1/32, para Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente; mientras que, para el resto de los serogrupos evaluados no se observó reactividad. Los resultados sobre el nivel de protección conferido por esta mezcla de sueros, mostraron un 80% y 60% de sobrevivencia en los animales retados con la cepa 12399, para las diluciones puro y 1/2, respectivamente. Mientras que, para la cepa 42600 los niveles de protección fueron más bajos (70% y 40%, respectivamente). Para el resto de las diluciones no se observó protección. Por otra parte, se observó un 100% de mortalidad en los controles, cuyas muertes ocurrieron entre los cinco a seis días posteriores al reto. Se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de sobrevivencia de los animales inmunizados y los controles para las diluciones de suero puro y 1:2 para la cepa de reto 12399; mientras que para la cepa 42600 fue significativa sólo para la muestra sin diluir ( $p<0,05$ ). La prueba Chi cuadrado mostró diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de protección conferida para cada una de las diluciones del suero de los hámsteres vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, frente al reto para una misma cepa de Ballum ( $p<0,05$ ) (tabla 13).

Los resultados de la técnica de MAT para la mezcla de los sueros de individuos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, mostraron títulos de 1/320, 1/128, 1/128, 1/64, 1/64, 1/32 y 1/32 para Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sarmin, Javanica, Pyrogenes y Australis, respectivamente; mientras que para el resto de los serovares evaluados no se observó reactividad. Resultados similares a los ya descritos en el experimento anterior, se obtuvieron con el suero de humanos vacunados con dos dosis de vax-SPIRAL<sup>®</sup> (tabla 14).

La evaluación de los niveles de aglutininas específicas inducidas en la mezcla de suero procedente de los animales inmunizados con las variantes monovalentes de Ballum, arrojó títulos de 1/128, 1/32, 1/32, 1/1024, 1/256, 1/4 para Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Ballum 12399, Ballum 42600 y Pyrogenes, respectivamente, en la variante monovalente 12399 y de 1/64, 1/16, 1/8, 1/128, 1/512 para Canicola, Icterohaemorrhagiae,

Pomona, Ballum 12399 y Ballum 42600, respectivamente, en la variante 42600; mientras que para el resto de los serovares evaluados no mostró reactividad. Como se puede apreciar en la tabla 15, hubo un 100% de protección con el serogrupo Canicola y con el serogrupo homólogo tanto para el serovar homólogo como para el heterólogo, mientras que para los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Pomona no se observó protección en los hámsteres inmunizados.

**Tabla 13. Protección pasiva conferida por las diferentes diluciones del suero de los hámsteres vacunados con vax-SPIRAL® (Lote 8027X), frente a aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas virulentas seleccionadas (12399 y 42600).**

Dilución del suero	Cepas del reto	Suero Vacunados n = 10	Suero Control n = 10
		%S	%S
Puro	12399	80*	0
	42600	70*	0
1/2	12399	60*	0
	42600	40	0
1/4	12399	0	0
	42600	0	0
1/8	12399	0	0
	42600	0	0

**Leyenda**

%S: Porcentaje de sobrevivencia

\* diferencia estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre animales inmunizados y sus controles

**Tabla 14. Resultados de la protección pasiva conferida por las diferentes diluciones del suero de humanos vacunados con vax-SPIRAL® (Lote 9009), frente a aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas virulentas seleccionadas (12399 y 42600).**

Dilución del suero	Cepas del reto	Suero Vacunados n = 10	Suero Control n = 10
		%S	%S
Puro	12399	80*	0
	42600	80*	0
1/2	12399	30	0
	42600	30	0
1/4	12399	0	0
	42600	0	0
1/8	12399	0	0
	42600	0	0

**Leyenda**

%S: Porcentaje de sobrevivencia

\* diferencia estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre animales inmunizados y sus controles

**Tabla 15. Protección pasiva conferida por el suero de hámsteres vacunados con las formulaciones monovalentes de Ballum, frente a aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas virulentas de los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Ballum (12399 y 42600).**

Variante del suero	Serovares del reto	Suero Vacunados n = 10	Suero Control n = 10
		%S	%S
Suero de animales inmunizados con monovalente de Ballum (12399)	Canicola	100*	0
	Icterohaemorrhagiae	0	0
	Pomona	0	0
	12399	100*	0
	42600	100*	0
Suero de animales inmunizados con monovalente de Ballum (42600)	Canicola	100*	0
	Icterohaemorrhagiae	0	0
	Pomona	0	0
	12399	100*	0
	42600	100*	0

**Leyenda**

%S: Porcentaje de sobrevivencia

\* diferencia estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre animales inmunizados y sus controles

#### **IV.6. Identificación de los serogrupos componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup> que confieren protección cruzada a *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum**

Los resultados de este trabajo mostraron una alta protección cruzada entre los serogrupos Canicola y Ballum. Se observó 100% de sobrevivencia en los animales inmunizados con la variante monovalente de Canicola y retados con ambas cepas de Ballum (12399 y 42600) y viceversa, respectivamente. Por otro lado, no se evidenció protección cruzada entre los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Ballum, ni entre Pomona y Ballum (tabla 16). Este estudio mostró también protección cruzada entre los serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae, pero no entre estos dos con Pomona.

De forma general, las muertes de los animales ocurrieron entre el cuarto y séptimo día (figura 17). Los primeros signos clínicos se observaron a partir de las 72 h posteriores al reto. Desde el punto de vista clínico y anatomopatológico macroscópico, los animales que no sobrevivieron el reto, presentaron signos y lesiones que avalaron el cuadro de la enfermedad leptospirósica, así como graves daños en las vísceras y los órganos; daños característicos en los órganos diana como el hígado y el riñón y las hemorragias pulmonares, entre otras. Por otra parte, la investigación macroscópica en los animales sobrevivientes al reto, no mostró daños en sus órganos y tejidos, es decir no se observaron signos de la enfermedad leptospirósica. Tampoco se aislaron leptospiras en los cultivos de los órganos diana (hígado y riñón).

En la tabla 17 se muestran los valores de la DL<sub>50</sub> 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 10 leptospiras para producir la infección y posteriormente la muerte de los animales inoculados.

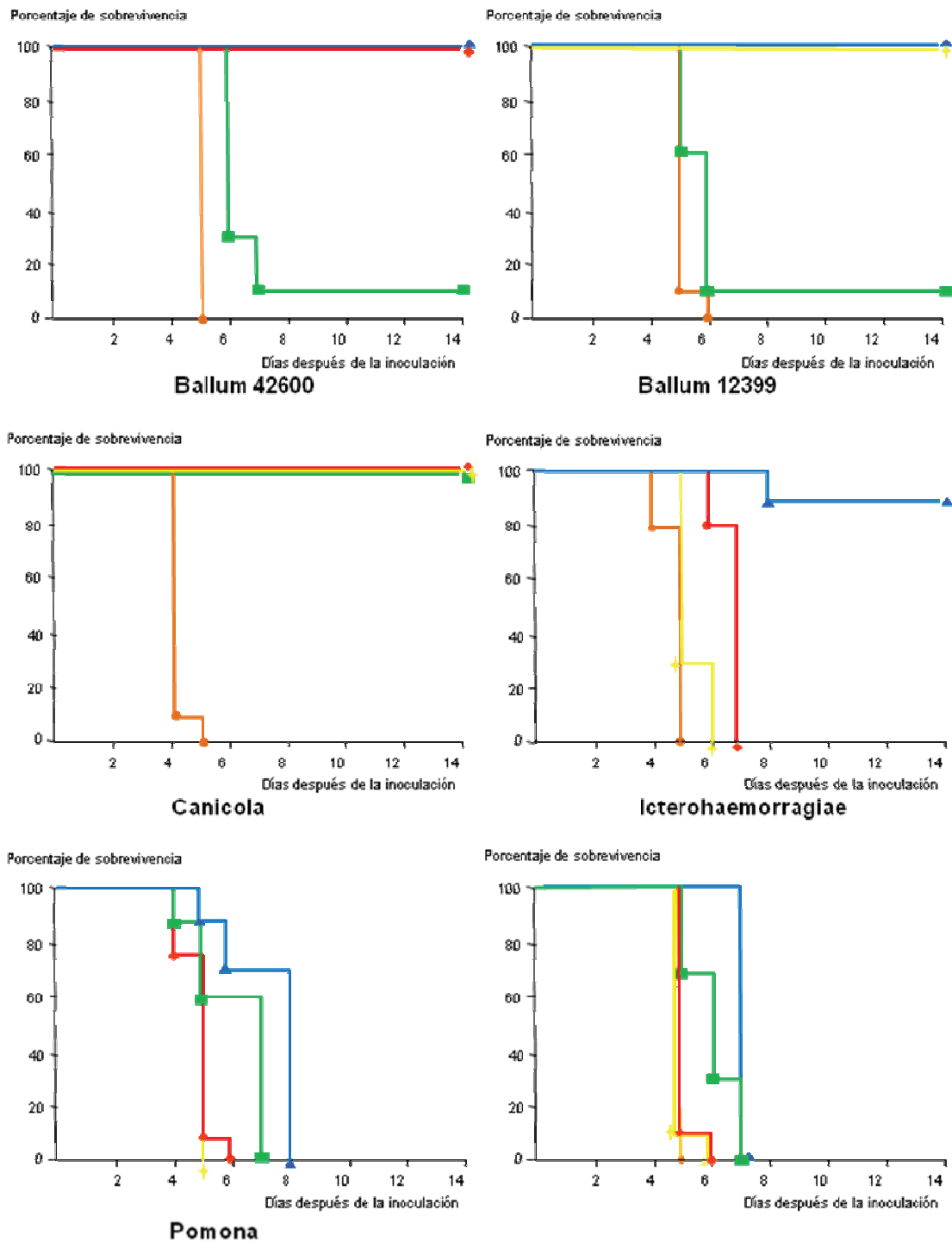


Figura 17. Análisis de Kaplan-Meier o curva de sobrevivencia de los hámsters inmunizados con las preparaciones monovalentes de: Ballum 42600, Ballum 12399, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, frente al reto con las cepas virulentas de ▲ Canicola, ■ Icterohaemorrhagiae, ● Pomona, ◆ Ballum 12399, y + Ballum 42600

**Tabla 16. Protección heteróloga de las preparaciones monovalentes de los serogrupos incluidos en vax-SPIRAL® y el serogrupo Ballum frente al reto heterólogo.**

Variante de vacuna	Serogrupo de reto	Sobrevivencia de los animales		Variante de vacuna	Serogrupo de reto	Sobrevivencia de los animales	
		%S	%M			%S	%M
Monovalente Canicola	Ictero.	100	0	Monovalente Ballum 42600	Canicola	100	0
	Pomona	0	100		Ictero	10	90
	Ballum (12399)	100	0		Pomona	0	100
	Ballum (42600)	100	0		Ballum (12399)	100	0
Monovalente Ictero	Canicola	90	10	Monovalente Pomona	Canicola	0	100
	Pomona	0	100		Ictero	0	100
	Ballum (12399)	0	100		Ballum (12399)	0	100
	Ballum (42600)	0	100		Ballum (42600)	0	100
Monovalente Ballum 12399	Canicola	100	0	Controles	Canicola	0	100
	Ictero	10	90		Ictero	0	100
	Pomona	0	100		Pomona	0	100
	Ballum (42600)	100	0		Ballum (12399)	0	100
					Ballum (42600)	0	100

**Leyenda**

% S porcentaje de sobrevivencia

% M porcentaje de mortalidad

**Tabla 17. Valores de DL<sub>50</sub> alcanzados en el estudio**

Cepas	Valores de DL <sub>50</sub> de los experimentos individuales		Valores promedios de la DL <sub>50</sub> (± SD)
	Antes	Durante	
Canicola	7	8	7,5 (0,7)
Ictero	5	5,4	5,2 (0,3)
Pomona	3	4	4,5(0,7)
12399	9,3	9,5	9,4 (0,1)
42600	8,5	7,5	8,0 (0,7)

**Leyenda**

DL<sub>50</sub>: Dosis letal media

#### **IV.7. Identificación de los antígenos de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum por anticuerpos inducidos en el suero de los hámsteres y los humanos vacunados con vax-SPIRAL®**

La conservación antigénica de las proteínas se demostró mediante la técnica de **immunoblotting**. Algunos de estos antígenos celulares altamente conservados fueron reconocidos por el suero de los hámsteres y humanos vacunados con vax-SPIRAL®, como las proteínas de 31, 32, 41, 45, 48 kDa y fundamentalmente los ubicados en la zona de 35-36 kDa (figura 18 y 19).

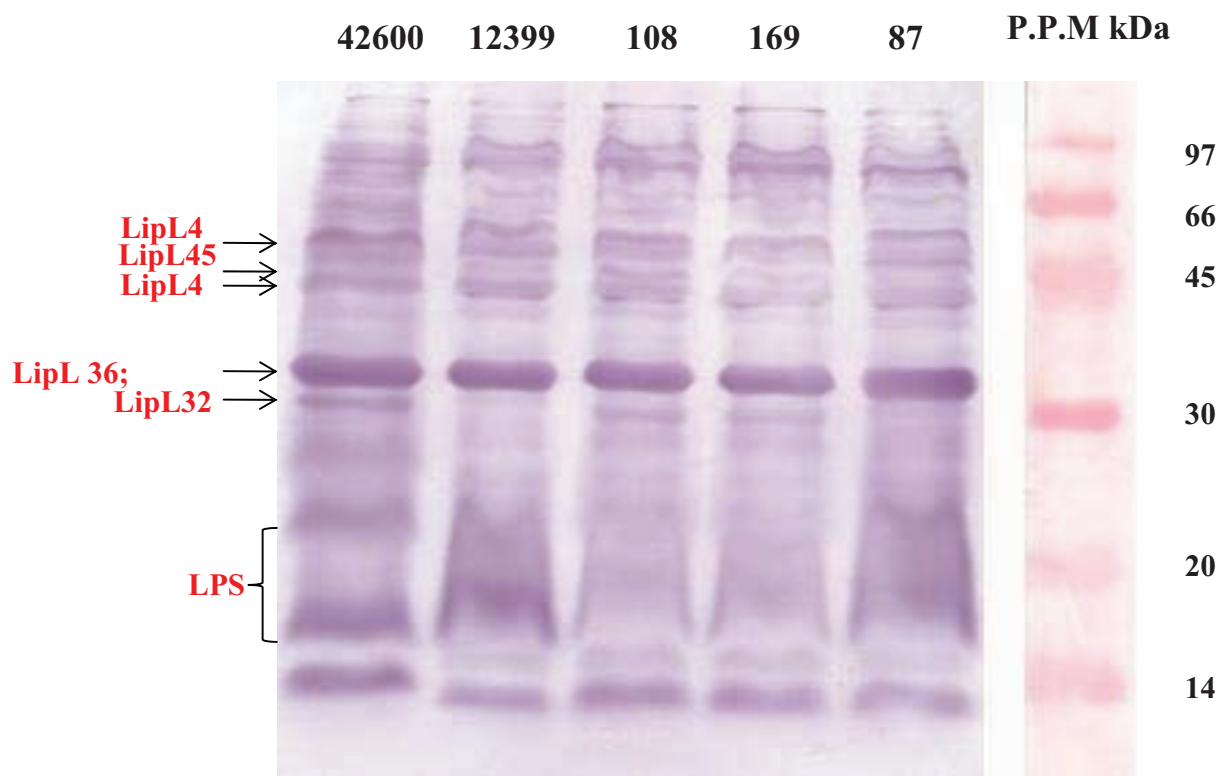


Figura 18. Análisis mediante Western blotting con el suero de los hámsters vacunados con dos dosis de vax-SPIRAL® de lisado de células completas de las cepas 87 (Canicola), 169 (Icterohaemorrhagiae), 108 (Pomona), 12399 (Ballum) y 42600 (Ballum).

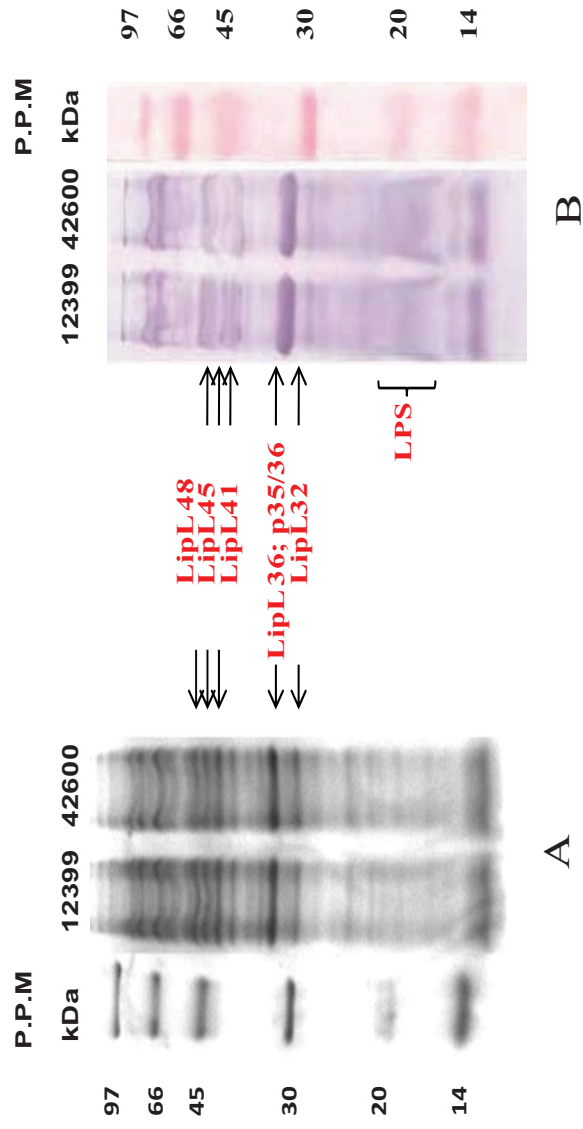


Figura 19. Análisis mediante SDS-PAGE unidimensional 12,5 % (A) y Western blotting con suero de humanos vacunados con dos dosis de vax-SPIRAL® (B) de lisado de células completas de las cepas 12399 y 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum.

## V. DISCUSIÓN

---

### V.1. Selección de las cepas candidatas vacunales

Uno de los primeros pasos en la confección de una vacuna antileptospirósica es la correcta selección y la caracterización de las cepas a utilizar como candidatas vacunales (Levett P, 2001; Faine S y cols., 1999). Las mismas deberán pertenecer a los serovares de leptospirosis contra los cuales se desea conferir la protección y deben también caracterizarse por su alta virulencia (Shenberg E y Torten M, 1973; WHO, 2003a). Teniendo en cuenta este criterio y dada la necesidad actual de obtención de nuevas formulaciones eficaces contra la infección por el serogrupo Ballum, se caracterizaron microbiológica e inmunológicamente cepas de este serogrupo de *Leptospira* con una alta circulación en Cuba.

La mayoría de las vacunas antileptospirósicas disponibles hasta la fecha confieren una inmunidad de corta duración y restringida al serogrupo/serovar componente de la formulación (Levett P, 2001). Por tal motivo, la pertenencia al serogrupo hacia el cual se desea conferir la protección es el principal rasgo que debe caracterizar a una cepa candidata vacunal (WHO, 2003a). Aunque en los últimos años han sido introducidos una gran variedad de modernos métodos para el análisis genético, el tipaje y la clasificación de cepas de *Leptospira*, la clasificación serológica mediante la técnica de microaglutinación constituye aún el método más utilizado, a pesar de ser laboriosa y limitada para la clasificación hasta serogrupo, si no se dispone de una batería de anticuerpos monoclonales (Terpstra W y cols., 2000). El empleo de esta técnica serológica ha permitido el reconocimiento de al menos 11 serogrupos patógenos de *Leptospira* en humanos con alta circulación en Cuba (Rodríguez I y cols., 2002) de los 24 que se reconocen actualmente (Brenner D y cols., 1999; Levett P, 2001).

Los antisueros policlonales de referencia y anticuerpos monoclonales específicos a *Leptospira* son producidos en muy pocos laboratorios especializados bajo procedimientos normalizados internacionalmente (Faine S, 1982). El uso de estas herramientas de clasificación serológica, permitió determinar el serovar de cada una de las cepas

seleccionadas del serogrupo Ballum, en Arborea para la cepa 12399 y Ballum para la cepa 42600.

Contar con aislamientos de cepas, caracterizadas por una elevada virulencia y representativas de los serogrupos circulantes en una región determinada, simplificaría la confección de una vacuna antileptospirósica hecha a la medida (Levett P, 2001; González A y cols., 2003c). Por tanto, una evaluación más completa de la capacidad de candidatos vacunales para inducir una respuesta inmunoprotectora, requiere un panel bien caracterizado de cepas virulentas que representen los serovares de importancia, tanto desde el punto de vista clínico como veterinario (WHO, 2003a).

Numerosos estudios han mostrado diferencias sustanciales en la expresión de los antígenos importantes en la patogénesis de la enfermedad leptospirósica, entre cepas isogénicas virulentas y avirulentas. Proteínas extracelulares (Volina E y cols., 1986), lipoproteínas de membrana externa (Matsunaga J y cols., 2002) y adhesinas (Ballard S y cols., 1986; Merien F y cols., 1997; 2000) se expresan mucho más por cepas virulentas que por sus variantes avirulentas. Esta desigual arquitectura antigénica, al parecer se revierte en una desigual capacidad protectora de unas y otras cepas al ser incluidas en preparados vacunales de células enteras (Bernasovskaia E, Kondratenko V y Melnitskaia E, 1994; Levett P, 2001; Cullen P y cols., 2002); de ahí la importancia de que las cepas seleccionadas muestren una elevada virulencia en los modelos animales y sea este otro importante criterio de selección.

Aunque la virulencia de los microorganismos patógenos es casi siempre cuantificada en modelos animales mediante el cálculo de la dosis letal media, en este trabajo de tesis se hicieron métodos cualitativos de estimación de la virulencia que, aunque menos exactos, fueron igualmente reproducibles y requirieron muchos menos animales, lo que los hace más apropiados para estimar simultáneamente esta capacidad en un gran número de cepas (González A y cols., 2002a). La determinación de la virulencia en hámsteres como segundo criterio de selección de las cepas candidatas vacunales, permitió disponer de dos

cepas con alta virulencia del serogrupo Ballum a partir de los 18 aislamientos pertenecientes a este serogrupo.

### **V.1.3. Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas**

El medio proteico EMJH es considerado un medio superior a los tradicionales medios naturales que contienen suero de conejo como constituyente esencial (Faine S, 1982; Ratnam S, 1994). Al ser un medio químicamente definido, permite superar la inconsistencia en el crecimiento originada por la variabilidad de la capacidad nutricional de los lotes de suero y reduce la reactogenicidad de preparados vacunales asociada a las proteínas del suero. A pesar de su elevado costo en el mercado internacional este medio sintético es actualmente el más utilizado para el aislamiento, mantenimiento y cultivo de cepas de leptospiras. No obstante, en ocasiones el EMJH es insuficiente para el aislamiento y cultivo de serovares de crecimiento fastidioso, los cuales requieren la adición de factores de crecimiento, mayormente proteicos, como suero de conejo, suero fetal bovino, hidrolizado de lacto-albúmina, superóxido dismutasa, entre otros (Staneck J y cols., 1973). Estos son componentes nutricionales poco convenientes para el escalado tecnológico y cultivo de antígenos vacunales para uso humano, dada la conocida reactogenicidad de pequeñas trazas de proteínas séricas en el producto final.

El serogrupo Ballum ha sido reconocido como un taxón que agrupa cepas de crecimiento fastidioso, con requerimientos nutricionales más exigentes que otras cepas patógenas de *Leptospira* (Johnson R y cols., 1973; Faine S, 1982). El serogrupo Canicola, a diferencia de Ballum, agrupa cepas con uno de los crecimientos menos fastidiosos dentro de las leptospiras patógenas (Johnson R y cols., 1973), por lo cual se incorporó la cepa vacunal 87 como referencia al evaluar el crecimiento de las cepas seleccionadas.

El mejoramiento de las características de los cultivos, luego de subcultivos semanales bajo las condiciones de temperatura y agitación empleadas sugirieron que ambas cepas clínicas, que no habían sido cultivadas *in vitro* con anterioridad al presente estudio, fueron adaptando paulatinamente su maquinaria metabólica a las nuevas condiciones nutricionales suministradas en el laboratorio, logrando una mejor asimilación de los

nutrientes del medio de cultivo tras sucesivos subcultivos. Los resultados logrados al evaluar la cinética de crecimiento de las cepas en medio EMJH bajo condiciones de cultivo agitado fueron superiores al cultivo estático, lo cual puede explicarse si tenemos en cuenta la naturaleza aerobia del metabolismo de *Leptospira* (Faine S, 1982; 1999; Murray P y cols., 1995).

Por otra parte, los resultados de las evaluaciones realizadas en este estudio confirmaron el carácter fastidioso del crecimiento *in vitro* de las cepas del serogrupo Ballum en comparación con aquel logrado por la cepa vacunal de *L. Canicola* bajo las mismas condiciones. Este crecimiento fastidioso fue aún más evidente tras la evaluación del mismo en las tres variantes medio libre de proteínas, utilizadas en el Instituto Finlay para la producción de los antígenos vacunales. Estos resultados pudieran esperarse si tenemos en cuenta que estos medios sintéticos contienen niveles aún menores de macronutrientes y factores de crecimiento (PNO, 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron no sólo la carencia o déficit de un nutriente esencial para el crecimiento de las cepas seleccionadas, sino además la presencia, en los tres medios evaluados, de al menos un componente con marcado efecto citotóxico, dada la generalizada mortalidad e incluso la apreciación de abundantes detritos celulares con tan solo 24 h de incubación.

El cultivo de las cepas vacunales de *Leptospira* en los medios libres de proteínas o con bajos niveles de estas, resulta de extrema importancia en la producción de vacunas poco reactogénicas para uso humano (WHO, 2003a). En el Instituto Finlay fue optimizada la variante de medio libre de proteínas desarrollada por Shenberg y Torten (Shenberg y Torten, 1973) para el cultivo final de los antígenos vacunales pertenecientes a los tres serovares incluidos en la vacuna vax-SPIRAL<sup>®</sup> (PNO, 2002). De esta forma, en la producción de esta vacuna trivalente, se emplean tres variantes de medio libre de proteínas con una composición nutricional similar, aunque no idéntica, los cuales soportan un buen crecimiento y logran mantener las principales propiedades de las cepas vacunales de los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Sin embargo, estos medios fueron altamente citotóxicos e ineficientes para el cultivo de las cepas seleccionadas de Ballum. Para la incorporación del serogrupo Ballum en una nueva formulación vacunal será

necesaria la obtención y optimización de un medio libre de proteínas que sustente un buen crecimiento de estas cepas fastidiosas, sin la afectación de otras propiedades importantes como su virulencia, antigenicidad e inmunogenicidad.

#### **V.1.4. Evaluación de la patogenia de la enfermedad en hámsteres**

Cuando la enfermedad se presenta en su forma natural, tanto en el hombre como en los animales domésticos y salvajes, el período de incubación oscila entre 7 y 12 días (Levett P, 2001; Oliva R y cols., 1998). Sin embargo, cuando se realizan infecciones experimentales, estos se acortan de 3 a 5 días (Malajov Y y cols., 2007). Estos resultados concordaron con las observaciones encontradas en la mayoría de las cepas virulentas evaluadas en este estudio en el biomodelo Hámster Sirio. Se utilizó la vía IP, que facilita una rápida incorporación de las leptospiras al torrente sanguíneo del animal (Oliva R y cols., 1998; González M y cols., 2004) y se emplearon altas cargas bacterianas. Lógicamente, la patogenia de la enfermedad sería más “demorada” si la infección fuese por las vías naturales y con menores cargas bacterianas.

La piloerección está asociada con el establecimiento de la fase leptospirémica de la enfermedad y con los picos de fiebre bifásicos (Oliva R y cols., 1998). Igualmente, la excitabilidad es un signo que, por lo general se manifiesta cuando aparecen estos picos de fiebre y comienzan los daños a nivel de sistema nervioso central (SNC) (Infante J y cols., 1998). La leptospirosis puede presentarse de forma ictérica o anictérica, lo cual está dado entre otros factores por las características propias de cada cepa (Vinetz J y cols., 2001; Sandow K y cols., 2005). Ambas cepas se comportaron de forma ictérica en el biomodelo animal. En la etiopatogenia de la leptospirosis se describe y es conocido que ella provoca ruptura del endotelio vascular (Terpstra W y cols., 2000; Cachay E y cols., 2005). En la mayoría de los animales (más del 50%), para ambas cepas, se encontraron evidencias de la ocurrencia de hemorragias a través de los orificios nasales.

Desde el punto de vista anatomopatológico macroscópico, predominó la presencia de cuadros congestivos y hemorrágicos en todos los órganos y sistemas; la presencia de íctero tanto en piel como en mucosas, se evidenció para las dos cepas. El análisis

macroscópico corroboró el hallazgo general y se constató de la presencia de procesos congestivos y hemorrágicos junto con las lesiones propias de caquexia (degeneraciones mucoides de las grasas renales y cardíacas y el agotamiento esplénico). Todo ello coincidió con las lesiones más comunes, descritas en las especies animales infectadas natural o artificialmente por este germen (Levett P, 2001; Silva E y cols., 2007). Los hallazgos histológicos encontrados en el hígado, el riñón y los pulmones son similares a los detectados en los animales y el hombre (Budieno E y cols., 2009; Spichler A y cols., 2008; Yang J y cols., 2009). Además, estos resultados fueron semejantes a los previamente descritos en curieles infectados de manera experimental con el serogrupo *Icterohaemorrhagiae*, donde el hígado presentó congestión, pérdida de la organización de los cordones de hepatocitos y diferentes grados de degeneración, así como necrosis y depósitos de hemosiderina (Alves V y cols., 1991; 1992).

#### **V.1.5. Determinación de la dosis letal media**

Ambas cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum mostraron una elevada virulencia en este modelo animal, los valores de  $DL_{50}$  obtenidos en ambos casos estuvieron en correspondencia con aquellos comúnmente mostrados por cepas de *Leptospira* altamente virulentas (González M y cols., 2004) y fueron comparables con las  $DL_{50}$  observadas para las cepas que conforman la actual vacuna antileptospirósica cubana vax-SPIRAL<sup>®</sup>. Este estudio además, corroboró la alta virulencia observada en la evaluación cualitativa de la misma.

#### **V.1.6. Identificación de los antígenos proteicos celulares y extracelulares**

La base antigénica para la clasificación de *Leptospira* en serovares radica en la composición y estructura de las cadenas polisacáridicas del LPS (Bulach D y cols., 2000). Dada la inmunodominancia de esta macromolécula de superficie, la inmunidad protectora conferida por las vacunas disponibles en la actualidad es serovar específica (Faine S y cols., 1999; Levett P, 2001). Los anticuerpos dirigidos contra el LPS, casi exclusivamente de tipo IgM (Guerreiro H y cols., 2001), confieren una completa protección homóloga tanto en los experimentos de protección activa (Midwinter A y cols., 1990; Sonrier C y cols., 2000) como pasiva (Jost B y cols., 1986; Masuzawa T y cols., 1990b). Pero no logran

conferir protección cruzada contra la infección por serovares heterólogos dada la gran variedad de formas de LPS presentadas al sistema inmune hospedero (Sonrier C y cols., 2000). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que extractos de proteínas de membrana externa carentes de LPS, logran conferir una completa protección homóloga y una parcial protección contra retos heterólogos (Sonrier C y cols., 2000). Por otro lado, combinaciones de proteínas de membrana externa recombinantes han logrado establecer protección homóloga y heteróloga parciales (Branger C y cols., 2001). Dada la inherente dificultad de preparar vacunas multivalentes de LPS (Midwinter A y cols., 1990), la identificación de antígenos proteicos conservados para su uso en la confección de vacunas de nueva generación, más puras, mejor definidas y capaces de conferir una protección de amplio espectro o para el diagnóstico temprano de la enfermedad, constituye un paso de vital importancia para el control eficaz de la leptospirosis humana y animal. Tomando este criterio como premisa y dado el hecho de que más de 11 serogrupos de *Leptospira* circulan en nuestro país como causa de infección en humanos, resultó de particular interés la identificación de los principales antígenos proteicos celulares y extracelulares expresados por las cepas candidatas vacunales, haciendo énfasis en aquellos altamente conservados entre los cuatro serogrupos de mayor circulación: Ballum, Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae.

Una gran diversidad de antígenos proteicos ha sido identificada mediante el estudio de los perfiles electroforéticos de células completas de *Leptospira*. Estos antígenos en su mayoría se ubican entre los 20 y 80 kDa e incluyen proteínas citoplasmáticas, periplasmáticas y de membrana interna y externa (Zuerner R y cols., 1991; Guerreiro H y cols., 2001; Cullen P y cols., 2002). El tratamiento de las muestras con enzimas proteolíticas ha demostrado que el LPS, principal antígeno inmunoprotector de *Leptospira*, se ubica por debajo de los 20 kDa (Chapman A y cols., 1991; Haake D y cols., 1991). Aunque comúnmente son identificados numerosos antígenos proteicos en los perfiles electroforéticos de células completas o fracciones de estas, sólo unos pocos han sido reconocidos. Muchos de los antígenos proteicos celulares identificados en las cepas de este estudio, pudieran corresponderse con algunas de las proteínas descritas y caracterizadas en la literatura de la última década, todas muy conservadas entre las cepas patógenas de *Leptospira*.

De esta forma, la banda antigénica de 32 kDa, comúnmente expresada por todas las cepas, pudiera corresponderse con la principal lipoproteína de membrana externa de *Leptospira*: LipL32 (Haake D y cols., 2000). Esta lipoproteína presenta una secuencia aminoacídica conservada entre las cepas patógenas y muestra altos niveles de expresión tanto *in vitro* como *in vivo* (Haake D y cols., 2000). LipL32 constituye el antígeno proteico más abundante en la membrana externa y el de mayor relevancia en la respuesta inmune frente a la infección natural, tanto en la fase aguda como en la convalecencia (Guerreiro H y cols., 2001; Cullen P y cols., 2002) y ha sido vinculada directamente con la inducción del daño a nivel de los túbulos renales (Yang C y cols., 2002). Estudios recientes, utilizando espectrometría de masa, han mostrado que LipL32 sufre modificaciones postransduccionales influenciadas por diversas condiciones ambientales, generando un gran número de proteínas de menor peso molecular, con funciones aún desconocidas, que son expresadas de manera simultánea con la lipoproteína de la membrana externa (Cullen P y cols., 2002). Algunos investigadores consideran a esta proteína como un marcador de infección sensible y específico, sugiriendo su uso en técnicas serológicas para el diagnóstico temprano de la enfermedad leptospirósica (Guerreiro H y cols., 2001). Por su parte, Branger y cols. sugieren que esta lipoproteína pudiera constituir un buen candidato para el desarrollo de una nueva generación de vacunas capaces de conferir, mediante métodos apropiados de inmunización, una protección de amplio espectro (Branger C y cols., 2001).

Otro antígeno identificado en todas las cepas fue una proteína de 36 kDa, la cual pudiera corresponderse con la lipoproteína de membrana externa LipL36 (Haake D y cols., 1998). Al igual que LipL32, esta lipoproteína de 36 kDa es expresada por un gran número de serovares patógenos, pero no por cepas saprofitas. Sin embargo, su expresión es regulada hasta niveles no detectables durante la infección *in vivo* o en condiciones *in vitro* que simulan el ambiente hospedero, tales como las temperaturas superiores a 30°C o la limitación de hierro (Haake D y cols., 1998; Barnett J y cols., 1999; Cullen P y cols., 2002). Algunos investigadores consideran que esta proteína pudiera participar en la adaptación del microorganismo a las condiciones ambientales externas al hospedero, una vez excretado a través de la orina. Sugieren además, que su aplicación como inmunógeno, pudiera generar

anticuerpos neutralizantes que ejerzan una acción rápida tras la entrada del patógeno al hospedero (Cullen P y cols., 2002), tal y como sucede con la proteína OspA en *Borrelia burgdorferi* (Steere A y cols., 1998). Sin embargo, la capacidad neutralizante de anticuerpos anti-LipL36 sería limitada, dado que esta proteína es expresada en la cara periplasmática de la membrana externa y no en la superficie microbiana expuesta al sistema inmune (Haake D y cols., 1998).

Otros antígenos proteicos de gran relevancia y muy conservados en las cepas patógenas, como la proteína transmembrana OmpL1 (Shang E y cols., 1995) y la lipoproteína LipL41 (Shang E y cols., 1996), pudieron ser expresados también por todas las cepas en estudio. La proteína de membrana externa OmpL1, es una proteína transmembrana que funciona como porina formando un poro hidrofílico, que permite el paso al interior de la célula de nutrientes hidrosolubles. Los niveles de expresión de esta porina son extremadamente bajos tanto *in vitro* como *in vivo* (Shang E y cols., 1995; Barnett J y cols., 1999) y algunos autores han correlacionado este hecho con el lento crecimiento de *Leptospira* (Haake D y cols., 1991). Esta proteína es muy sensible al calor y a las condiciones reductoras, mostrando un patrón de movilidad electroforética inusual. En su forma no desnaturalizada, la más abundante bajo las condiciones de separación empleadas en este trabajo, migra con una masa molecular aparente de 25 kDa; mientras que en su forma desnaturalizada (extracción con urea y altas temperaturas por más de 15 minutos) migra mayoritariamente cercano a los 33 kDa (Shang E y cols., 1995). Aunque OmpL1 es expresada *in vivo*, difícilmente logra ser identificada mediante **immunoblotting** unidimensional por el suero de convalescientes debido a que su reconocimiento queda enmascarado por la amplia reactividad del LPS (Guerreiro H y cols., 2001).

Por su parte, la lipoproteína LipL41 es expresada tanto en la membrana externa como en la membrana citoplasmática, pero a diferencia de LipL36 aparece expuesta en la superficie del microorganismo y no hacia el lado periplasmático de la membrana externa (Shang E y cols., 1996; Haake D y cols., 1998). Estudios recientes han mostrado un efecto sinérgico en la protección homóloga conferida por OmpL1 y LipL41 recombinantes al ser aplicadas juntas y asociadas a una membrana bacteriana (Haake D y cols., 1999). Sin embargo, la

administración de estas proteínas por separado o juntas, pero no asociadas a membrana no logró los mismos niveles de protección. Ello sugiere la existencia de epítopes conformacionales de gran relevancia y la importancia de una adecuada forma de presentación de los antígenos al sistema inmune, para lograr los niveles de inmunoprotección deseados (Haake D y cols., 1999). Aunque los animales inmunizados no fueron retados con serovares heterólogos en el estudio, la gran homología antigénica de LipL41 y OmpL1 entre los serovares patógenos de *Leptospira* sugieren que estas proteínas pudieran conferir al menos una protección cruzada parcial (Haake D y cols., 1999).

Todas las cepas expresaron uniformemente una proteína de 45 kDa, la cual pudiera corresponderse con la lipoproteína de membrana interna LipL45, muy conservada entre las cepas patógenas de *Leptospira* (Matsunaga J y cols., 2002). Esta lipoproteína es expresada *in vivo*, pero en condiciones *in vitro* solo es expresada por cepas virulentas con un limitado número de subcultivos, por lo cual ha sido considerada como un marcador de virulencia (Matsunaga J y cols., 2002). LipL45 genera, por clivaje postransduccional, una proteína periférica de 31 kDa (P31), que se encuentra asociada tanto a la membrana externa como a la interna, siendo la primera proteína periférica descrita para *Leptospira*. Al igual que LipL45, P31 se expresa tanto *in vivo* como *in vitro*, pero a diferencia de ella su expresión no disminuye con la atenuación de la virulencia de la cepa tras numerosos subcultivos, siendo expresada tanto por cepas virulentas como por sus variantes avirulentas con un pico de expresión en la fase estacionaria del crecimiento (Matsunaga J y cols., 2002). Se piensa que P31 es generada por la acción de una enzima proteolítica que escinde a LipL45 por la región anclada a la membrana citoplasmática, liberando la porción de proteína extendida hacia el espacio periplasmático que luego se asocia tanto a la membrana externa como a la interna. Al parecer, la acción de la proteasa se incrementa mediante el cultivo reiterado *in vitro* y disminuye durante la infección *in vivo*. Dada la ubicación no superficial de ambas proteínas en la célula, no se produce un fuerte reconocimiento de las mismas por el suero de convalescientes, aunque sí por el suero de animales inmunizados con células completas. Este resultado llevó a los investigadores a concluir que la inmunización con suspensiones de células completas, a diferencia de la

infección natural, permite la producción de anticuerpos contra antígenos inaccesibles al sistema inmune hospedero en una célula viva (Matsunaga J y cols., 2002).

Otras proteínas celulares de *Leptospira* como LipL48 (Haake D y Matsunaga J, 2002), OmpL39 (Zhang Y y cols., 1998) o las adhesinas de 36 kDa (Merien F y cols., 2000), también pudieran ser expresadas por todas las cepas. Análisis mediante SDS-PAGE bidimensional y espectrometría de masa han identificado un mínimo de 67 especies proteicas individuales sólo en la membrana externa de *Leptospira*, incluyendo al menos 12 como productos de genes diferentes (Cullen P y cols., 2002). A esta elevada lista de proteínas se suman otras cuya expresión sólo se produce *in vivo*, como la recientemente descrita LigA de 130 kDa (Palaniappan R y cols., 2002), detectada mediante el tamizaje de una biblioteca genómica con suero de convalescientes.

A diferencia del creciente interés en el estudio de los componentes estructurales de *Leptospira* y el gran número de investigaciones realizadas con esta finalidad en la última década, son relativamente pocos los trabajos encaminados al estudio y la caracterización de componentes extracelulares, a pesar de su papel potencial en la patogénesis de la leptospirosis. Fosfolipasas, hemolisinas y esfingomielinasas han sido identificadas en los sobrenadantes de los cultivos de *Leptospiras* patógenas (Volina E y cols., 1986; Segers R y cols., 1990; Zuerner R y cols., 1991; Lee S y cols., 2000; 2002). En particular las hemolisinas de *Leptospira* constituyen verdaderas citotoxinas con actividad enzimática (Del Real G y cols., 1989; Segers R y cols., 1990) o formando poros hidrofílicos (Lee S y cols., 2000; 2002) en la membrana de numerosas células epiteliales de mamíferos. El daño directo a la membrana de las células hospederas pudiera contribuir a las hemorragias y al fallo renal, rasgos principales de la leptospirosis severa. La ruptura de las barreras celulares epiteliales pudiera contribuir a la alta invasividad y diseminación sistémica de este microorganismo, capaz de producir daño en prácticamente todos los órganos del hospedero (Ratnam S, 1994; Lee S y cols., 2002). La identificación y neutralización de estas potencialidades, pudiera constituir un punto clave en la protección contra la enfermedad leptospirósica y su evolución clínica, tal y como sucede con otras enfermedades bacterianas (Haga Y y cols., 1997). Por tal motivo, resultó de gran interés la

identificación en las cepas seleccionadas de antígenos proteicos extracelulares, los cuales pudieran constituir potenciales citotoxinas y componentes de una formulación vacunal de nueva generación.

Dain y colaboradores clonaron y expresaron en *Escherichia coli* una hemolisina de 67 kDa a partir de un gen de *Leptospira interrogans* serovar Pomona (Dain A y cols., 1985). Por su parte Del Real y colaboradores en 1989, clonaron una hemolisina con actividad esfingomielinasa a partir de un gen de *L. Hardjo*, también presente en los serovares *L. Tarassovi* y *L. Ballum* (Del Real G y cols., 1989). Años más tarde el mismo colectivo de autores pudo comprobar que la esfingomielinasa recombinante expresada en *E. coli* como una proteína secretable de 39 kDa era resultado de un procesamiento postransduccional de una proteína funcional mayor asociada a la célula de *Leptospira*, que al escindirse por la región del péptido señal originaba realmente una hemolisina extracelular de 60 kDa, con actividad esfingomielinasa que recibió el nombre de SphA. El gen que codificaba para esta hemolisina (*spha*) estaba también presente en los serovares *L. Canicola* y *L. Pomona* (Segers R y cols., 1990). Estudios más recientes han identificado una nueva hemolisina en *L. Lai* homóloga a la esfingomielinasa SphA de *L. Hardjo*, pero con un mecanismo de acción diferente. A pesar de tener un peso molecular similar, estimado en aproximadamente 60 kDa, la nueva hemolisina denominada SphH carece de actividad esfingomielinasa o fosfolipasa, pero causa daño a numerosas células de mamíferos mediante la formación de poros hidrofílicos estables en la bicapa lipídica. Estos poros alteran irreversiblemente la permeabilidad de la membrana permitiendo el paso indiscriminado de iones y pequeñas moléculas, lo cual conlleva al aumento de la presión osmótica intracelular y consecuentemente a la lisis celular (Lee S y cols., 2000; 2002). Tanto la hemolisina SphA como la SphH pudieran estar siendo expresadas por nuestras cepas y no detectadas, por la distorsión que produce la albúmina sérica bovina del sobrenadante (procedente del medio de cultivo) en los patrones electroforéticos. La eliminación de la albúmina mediante métodos cromatográficos, pudiera contribuir a una mayor detección de proteínas extracelulares en los sobrenadantes de las cepas de interés.

No fue objetivo de este trabajo la detección de actividades enzimáticas o citotóxicas en el sobrenadante de los cultivos bacterianos. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten inducir que de forma similar a lo que ocurre con los antígenos proteicos celulares, existió una gran homología en la expresión de proteínas extracelulares entre los cuatro serogrupos de *Leptospira* de mayor circulación entre humanos en Cuba. Todo lo cual refleja la necesidad de una vacuna potencialmente mixta, polivalente.

## **V.2. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora homóloga y heteróloga de preparados vacunales monovalentes de serogrupo Ballum**

El uso de hámsteres como modelo animal para la evaluación de la inmunogenicidad y la potencia de vacunas antileptospirósicas, ha sido reportado por numerosos investigadores (Shenberg E y Torten M, 1973; Adler B y Faine S, 1980a; Oliva R y cols., 1994, Barnett J y cols., 1999; Haake D y cols., 1999; 2000; Matsunaga J y cols., 2002). Este modelo animal es el recomendado por la actual Farmacopea Europea para la evaluación de la potencia de vacunas comerciales contra *Leptospira* (European Pharmacopoeia, 1997). En 1973, Shenberg y Torten desarrollaron la primera vacuna antileptospirósica para uso humano elaborada con leptospiras crecidas en un medio completamente sintético libre de proteínas (Shenberg E y Torten M, 1973). Antes de su evaluación en humanos, la vacuna bivalente Shen-Tor demostró su inmunogenicidad y capacidad de protección homóloga en hámsteres (Shenberg E y Torten M, 1973). La evaluación preclínica de la inmunogenicidad se realizó mediante MAT, siguiendo un esquema de inmunización de dos dosis intramusculares separadas por un intervalo de 10 días y tomando como criterio de seroconversión, al menos la duplicación de los niveles de aglutininas 30 días después de la segunda dosis vacunal. La potencia o capacidad de protección homóloga se determinó evaluando la protección en hámsteres contra la infección letal y el estado de portador posterior al reto con 10 000 DL<sub>50</sub> de cada cepa vacunal. La protección contra el estado de portador, se evaluó mediante el cultivo en medio Korthof de secciones de riñón de los animales sobrevivientes al reto. Estas pruebas preclínicas, unidas a las evaluaciones de la seguridad e inocuidad en hámsteres y curieles, fueron suficientes para que el Ministerio de Salud Pública de Israel, autorizara la evaluación clínica de esta vacuna en voluntarios y posteriormente su aplicación masiva a las poblaciones de riesgo (Torten M y cols., 1973).

Los elevados títulos de aglutininas inducidos por las preparaciones monovalentes, empleadas en este estudio, no sólo mostraron una alta inmunogenicidad en hámsteres, sino que además superaron los títulos medios homólogos inducidos por otras vacunas antileptospirósicas adyuvadas como vax-SPIRAL<sup>®</sup> (Instituto Finlay, 1998), a pesar de seguir el mismo esquema de inmunización en el mismo modelo animal, lo cual pudiera deberse a la mayor concentración de epítopes inmunodominantes serogrupo/serovar específicos presentes en las formulaciones monovalentes en comparación con lo que presenta la vacuna trivalente vax-SPIRAL<sup>®</sup> para cada una de las serovariedades que la componen. Otras vacunas no adyuvadas como Shen-Tor, aunque protectoras, han sido poco inmunogénicas tanto en animales como en humanos (Shenberg E y Torten M, 1973; Torten M y cols., 1973), por lo que algunos investigadores señalan la no existencia de correlación entre los niveles de aglutininas estimados por la técnica de MAT y la protección (Shenberg E y Torten M, 1973; Torten M y cols., 1973; Chapman A y cols., 1991).

Cada preparación vacunal monovalente de *Leptospira* Ballum evaluada contiene  $1,5 \times 10^8$  células/dosis. Esta misma carga antigénica total está contenida en la vacuna trivalente pero repartida en tres serovares diferentes, es decir  $5 \times 10^7$  células de cada serovar por dosis de vacuna. En cuanto a los antígenos conservados, ambas vacunas (monovalente y trivalente) tienen una carga antigénica similar, pero en cuanto a antígenos serogrupo/serovar específicos las preparaciones monovalentes contenían tres veces lo que contiene la trivalente para cada uno de sus serovares componentes. Las respuestas de aglutinación tienen su base molecular en el reconocimiento y unión específica de las aglutininas del suero a una gran diversidad de epítopes de superficie expresados en la membrana externa del microorganismo. Dada la inmunodominancia del LPS, la mayor cantidad de aglutininas inducidas por la inmunización activa con células enteras, va dirigida hacia epítopes serovar específicos ubicados en las cadenas polisacáridicas de esta macromolécula; aún cuando la fracción de aglutininas restante, dirigida fundamentalmente contra los antígenos proteicos altamente conservados, es suficiente para una completa protección homóloga y una parcial protección heteróloga (Sonrier C y cols., 2000). Ello pudiera ser la causa de una mayor inmunogenicidad en los hámsteres de las preparaciones vacunales monovalentes utilizadas

en este estudio frente al antígeno homólogo, en comparación con vax-SPIRAL<sup>®</sup> según la técnica de MAT.

Los resultados obtenidos demostraron que, aún cuando los anticuerpos dirigidos a los epítopes serogrupo/serovar específicos son principalmente de tipo IgM (Guerreiro H y cols., 2001), la fracción de anticuerpos IgG dirigida a estos determinantes antigénicos también es considerable y, al parecer, mucho mayor que aquella dirigida a los epítopes conservados entre los serovares diferentes. Los resultados sugirieron, además, una mayor comunidad antigénica del serogrupo Ballum con Canicola, en comparación con Icterohaemorrhagiae y Pomona. Una mayor presencia o expresión de epítopes inmunogénicos por parte de la cepa seleccionada (12399), pudiera ser la causa de su mayor inmunogenicidad en los hámsteres, en comparación con la cepa 42600 bajo los mismos criterios de formulación.

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 (Shenberg E y Torten M, 1973; Torten M y cols., 1973; Martínez R y cols., 2000). 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 leptospiruria) (Babudieri B, Castelli M y Pisoni F, 1973). 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. Aunque en el hombre el estado de portador sólo dura un corto periodo de tiempo después de la infección natural y usualmente éste no constituye una fuente importante de diseminación de la enfermedad, en los 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 (Faine S, 1982; 1999). Por tal motivo, el establecimiento de una eficaz protección no sólo contra la infección letal sino además contra el estado de portador, debe caracterizar a una buena vacuna profiláctica contra la leptospirosis.

Varios investigadores han considerado el cultivo de órganos como una metodología sensible y en muchos casos suficiente para evaluar la protección contra el estado de portador, conferido por las vacunas antileptospirósicas (Shenberg E y Torten M, 1973; Babudieri B, Castelli M y Pisoni F, 1973). Los resultados de la protección contra el estado de portador, obtenidos con las preparaciones monovalentes de *L. Ballum* evaluadas, estuvieron en concordancia con los obtenidos para otras vacunas antileptospirósicas adyuvadas (Instituto Finlay, 1998) y en ello jugó, al parecer, un papel fundamental la respuesta inmune celular potenciada por el hidróxido de aluminio. Este compuesto es un adyuvante de depósito que potencia tanto la inmunidad humoral como celular (Krishman L y cols., 2000) y ha demostrado ser un componente clave en formulaciones antileptospirósicas que protegen contra el estado de portador en los animales (Naiman B y cols., 2001; 2002). Variantes no adyuvadas de la vacuna cubana demostraron ser menos inmunogénicas y protectoras en los modelos animales (Instituto Finlay, 1998).

Las diferencias observadas en la magnitud de la respuesta IgG inducida frente al antígeno homólogo por una y otra preparación vacunal, no fueron determinantes en la protección conferida ya que ambos preparados fueron inmunogénicos y confirieron una completa protección homóloga. Se comprobó, para ambas preparaciones, la existencia de correlación entre los niveles de seroconversión de IgG específica inducidos en la población animal vacunada y la protección observada frente al reto con aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cepas utilizadas.

Muy pocos han sido los estudios encaminados a demostrar la existencia de protección cruzada entre los serogrupos diferentes de *Leptospira*. Hasta hace algunos años estaba bien establecido que la protección conferida luego de una infección natural o inmunización era serogrupo/serovar específica (Levett P, 2001; Faine S, 1999). Sin embargo, los conceptos sobre la inmunidad contra la infección leptospirósica se han ido modificando a la luz de los conocimientos actuales.

Trabajos muy recientes indican la inducción de una potente respuesta celular posterior a la inmunización con vacunas antileptospirósicas adyuvadas (Naiman B y cols., 2001), aunque

este patrón de respuesta no se produce como resultado de la infección natural o, al menos, en la misma magnitud (Naiman B y cols., 2002). Por otro lado, Sonrier y colaboradores, demostraron la inducción de una protección cruzada estadísticamente significativa por la fracción proteica de cepas del serovar *L. Autumnalis* frente al reto con *L. Canicola* en gerbils (Sonrier C y cols., 2000). La inmunización de gerbils con proteínas de *L. Autumnalis* recombinantes expresadas en adenovirus, protegió a 13 de 15 animales frente a una protección en 8 de 16 animales placebos luego del reto con 10 000 leptospiras virulentas; sin embargo los autores no aclaran el número de DL<sub>50</sub> equivalentes al reto realizado, a lo cual se une la desventaja de un 50% de protección observada en los placebos (Branger C y cols., 2001).

Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron una significativa protección de una de las monovalentes de *L. Ballum* frente al reto con 100 DL<sub>50</sub> de *L. Canicola*. La magnitud de esta dosis de reto heterólogo está en correspondencia con la utilizada por Branger y cols. (2001), por lo que se pudo concluir que existió una protección cruzada entre los serogrupos *Ballum* y *Canicola*. La importancia de este resultado es aún más evidente, si se tiene en cuenta que es muy poco probable una infección natural en animales o humanos con dosis tan elevadas como las utilizadas en el ensayo. La protección cruzada conferida frente al reto con los serogrupos *Icterohaemorrhagiae* o *Pomona* fue menos relevante.

Los resultados de las evaluaciones serológicas realizadas estuvieron en correspondencia con la protección observada en el modelo animal, lo cual corroboró la importancia de la respuesta inmune en la protección contra la infección leptospirósica (Levett P, 2001; Faine S y cols., 1999).

### **V.3. Evaluación del efecto de una inmunización con una dosis única de *Leptospira interrogans* serogrupo *Ballum* en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL®**

La célula de *Leptospira* es un complejo multiantigénico conformado por antígenos serogrupo/serovar específicos y por otros altamente conservados en la especie o el género (Levett P, 2001). Luego de la inmunización con dos dosis de células completas de los serogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*, se genera una respuesta de

anticuerpos dirigida a uno y otro tipo de antígenos, aún cuando la fracción predominante de anticuerpos va dirigida a epítopes específicos de estas serovariedades (Levett P, 2001; Midwinter A y cols., 1990). Al aplicar una tercera dosis con un serogrupo diferente, se producirá una respuesta primaria frente a los antígenos específicos de este serogrupo. Sin embargo, persistirán en el organismo animal células de memorias sensibles a los antígenos compartidos con los serogrupos componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup>, las cuales generarán un rápido y elevado incremento de anticuerpos, al ponerse nuevamente en contacto con estos antígenos conservados. Esta misma respuesta secundaria deberá generarse con una infección natural heteróloga en el período post-vacunación; de esta forma, el animal inmunizado estará mejor protegido frente a una infección heteróloga, mientras mayor sea la memoria inmunológica a los antígenos conservados, lo cual dependerá en gran medida del establecimiento de una eficiente inmunidad como resultado de la vacunación. El establecimiento de una ineficiente inmunidad posterior a la inmunización con células completas de *Leptospiras* repercutirá no sólo en la capacidad de protección homóloga sino también en la posible protección heteróloga que la vacuna aplicada pueda conferir.

La vacuna antileptospirosis trivalente vax-SPIRAL<sup>®</sup>, diseñada para establecer protección frente a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, ha mostrado una eficacia global en el terreno de más de un 60% (Instituto Finlay, 1998). Estos resultados sugieren el establecimiento de un determinado nivel de protección cruzada en humanos frente a la infección con serovariedades no incluidas en la formulación, lo cual incluye al serogrupo Ballum, el serogrupo más aislado de muestras clínicas (Rodríguez I y cols., 2002). Esta inmunidad cruzada de vax-SPIRAL<sup>®</sup> frente a *L. Ballum* en personas vacunadas, supondría un efecto búster o de refuerzo de la inmunidad en estas personas, al entrar en contacto con el antígeno de *L. Ballum* de forma natural o como resultado de una inmunización.

La aplicación de una vacuna monovalente de *L. Ballum* en animales inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, no sólo indujo un aumento sobre la inmunidad cruzada de *L. Ballum*, ya establecida por la vacuna trivalente, sino que además reforzó la respuesta humoral a los tres serogrupos vacunales.

#### **V.4. Evaluación de la inmunidad cruzada en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL®**

Aunque la inmunidad conferida por las vacunas antileptospirósicas disponibles en la actualidad es serogrupo/serovar específica, estudios recientes muestran la capacidad de proteínas conservadas para ejercer cierta protección. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una importante comunidad antigénica entre el serogrupo Ballum y al menos uno de los tres serogrupos componentes de la vacuna trivalente vax-SPIRAL®, lo cual determinó la inducción de una fuerte inmunidad cruzada con capacidad protectora, frente a la infección experimental con *L. Ballum* en hámsteres inmunizados con la vacuna trivalente. Estos resultados en el modelo animal estuvieron en correspondencia con la elevada eficacia global que muestra vax-SPIRAL® en humanos en el terreno. De esta forma, los casos confirmados de infección por Ballum en personas vacunadas con vax-SPIRAL®, pudieran asociarse entonces con el establecimiento de una ineficiente inmunidad en estas personas, así como con la pérdida de la capacidad de protección cruzada durante el periodo posvacunación o, en último caso, con la no-existencia de una fiel correlación entre la protección cruzada lograda en el modelo animal y la conferida a los humanos vacunados. No obstante, un 60,4% de la eficacia global luego de un año de vigilancia epidemiológica posvacunación en los humanos (Instituto Finlay, 1998; Martínez R y cols., 2000), avalan los resultados de la protección cruzada obtenidos en el modelo animal 14 días después de culminado el esquema de inmunización.

#### **V.5. Inmunización pasiva**

Los estudios de protección pasiva constituyen una valiosa herramienta para demostrar las potencialidades protectogénicas de los preparados vacunales contra la leptospirosis (González M y cols., 1997; 2001; González A, 2002b).

La respuesta de los anticuerpos, generada tras la infección natural o la inmunización con vacunas antileptospirósicas en humanos o animales, comprende fundamentalmente aglutininas y opsoninas de tipo IgM e IgG (Chapman A y cols., 1990; 1991; Levett P, 2001; Guerreiro H y cols., 2001). Aún cuando la técnica de microaglutinación logra detectar tanto aglutininas de tipo IgM como IgG, varios investigadores consideran que las técnicas de aglutinación no son lo suficientemente sensibles para estimar los niveles reales de IgG,

dado que esta clase de inmunoglobulina no tiene la capacidad aglutinante de la IgM (Adler B y Faine S, 1980a; 1980b). La elevada valencia de la IgM determina su alta eficiencia como anticuerpo aglutinante, mientras la IgG sólo contribuye parcialmente a la reacción de aglutinación y se encuentra estrechamente asociada a la actividad opsonizante y neutralizante (Roit I, 2003). La capacidad de protección pasiva en hámsteres del suero de los vacunados o convalecientes depende de los niveles de aglutininas de ambas clases de anticuerpos (Adler B y cols., 1980a; González M y cols., 2001). Aunque la respuesta humoral dirigida al LPS, principal antígeno inmunoprotector de *Leptospira*, es casi exclusivamente de tipo IgM (Guerreiro H y cols., 2001), los niveles de IgG persisten por más tiempo tras la infección natural o vacunación y van dirigidos principalmente a los antígenos proteicos, potenciales dianas de una respuesta protectora de amplio espectro (Guerreiro H y cols., 2001; Sonrier C y cols., 2000). Por otro lado, algunos trabajos demuestran la inducción de una elevada protección en los animales y humanos con bajos títulos por la técnica de MAT pero altos niveles de IgG, por lo que varios autores han declarado la no-existencia de correlación entre el título de anticuerpos por MAT y el nivel de protección (Shenberg E y cols., 1973; Torten M y cols., 1973; Chapman A y cols., 1991).

Los niveles de anticuerpos detectados en las muestras de sueros, tanto de hámsteres como de humano, fueron capaces de proteger a los animales inmunizados pasivamente y retados con 10 000 DL<sub>50</sub> de los serovares de *L. Ballum* (12399 y 42600), habiéndose observado entre un 80-70% de sobrevivencia con el suero puro, lo que habla de la presencia de reactividad cruzada entre estos serovares no incluidos en la vacuna cubana antileptospirosis y los serovares componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup>. Además corroboran, aunque mediante la protección pasiva, la capacidad protectora de vax-SPIRAL<sup>®</sup> frente a otros serovares no incluidos en su formulación, ya reportada por otros autores sobre un 60,4% de protección global (Martínez R y cols., 2004). No fue objetivo de este trabajo evaluar la existencia de correlación entre los niveles de IgG específica inducidas en vacunados y la protección pasiva, aunque González y colaboradores, mediante un estudio de protección pasiva, lograron demostrar la existencia de una correlación entre los niveles de IgG específica inducida en vacunados y la protección pasiva del suero en hámsteres (González M y cols., 2001).

El suero proveniente de hámsteres y humanos inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, respectivamente, fue capaz de conferir una alta protección a los animales inmunizados con la dilución 1/1, mientras que la dilución 1/2 confirió protección parcial y las restantes no confirieron protección. Este resultado pudiera explicarse si tenemos en cuenta que no resulta igualmente efectiva la protección pasiva con relación a la protección activa, ya que en esta última intervienen otros mecanismos como la respuesta celular. Mientras que, en la inmunización pasiva son los anticuerpos directamente los que intervienen en la respuesta y las concentraciones de éstos tienen que ser suficientes para llegar al sitio donde actúan las leptospiras y propiciar su fagocitosis. De ahí que los niveles de aglutininas presentes en las diluciones 1/4, 1/8 de los sueros no fueran capaces de inducir una respuesta protectora en los animales inmunizados y la dilución 1/2 confiriera una protección parcial. Además la DL<sub>50</sub> empleada (10 000 DL<sub>50</sub>) fue alta, pero para leptospira se utilizan dosis de reto entre 10-10 000DL<sub>50</sub> para simular lo que pasaría en condiciones naturales para el humano. De haber utilizado en nuestro estudio dosis inferiores dentro del mismo intervalo podrían obtenerse mejores resultados.

Por otra parte, los resultados obtenidos del estudio de protección pasiva con el suero de los animales inmunizados con las preparaciones monovalentes de *L. Ballum*, mostraron un 100% de protección pasiva frente al reto homólogo y heterólogo (Canicola y Ballum). Sin embargo, no se observó protección con los serogrupos heterólogos *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*. Aspecto este que ya se había observado en la evaluación de la protección activa en este mismo trabajo en el acápite IV.2.

#### **V.6. Identificación de los serogrupos componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup> que confieren protección cruzada a *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum**

Hay pocos estudios dirigidos a demostrar la existencia de protección cruzada y heteróloga entre los diferentes serogrupos de *Leptospira* (Sonrier C y cols., 2000), pues la mayoría de las vacunas antileptospirósicas disponibles en la actualidad, confieren una inmunidad serogrupo/serovar específica (Levett P, 2001; Faine S, 1999).

Sin embargo, otros autores han reportado la existencia de protección cruzada entre los serogrupos componentes de vax-SPIRAL<sup>®</sup> y el serogrupo Ballum (González A y cols., 2003a). Pero por primera vez, en este trabajo se evidenció con claridad, cuál de los serogrupos componentes de la vacuna cubana fue el responsable de esta protección hacia el serogrupo Ballum, lo cual representó una de las novedades científicas de este trabajo. Los resultados obtenidos evidenciaron una completa protección cruzada entre el serogrupo Canicola y el serogrupo Ballum al observarse un 100% de sobrevivencia de los animales frente al reto con leptospiras altamente virulentas. Se observó, además, cierta protección cruzada con el serogrupo Icterohaemorrhagiae; mientras que no se encontró protección cruzada con el serogrupo Pomona.

#### **V.7. Identificación de los antígenos de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum por el suero de hámster y humanos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>**

El suero de animales inmunizados con una cepa de *Leptospira* reconoce comúnmente numerosas proteínas de una gran variedad de serovares (González A y cols., 2003c). El reconocimiento observado de estos antígenos celulares por el suero de hámsteres y humanos vacunados con la vacuna trivalente, vax-SPIRAL<sup>®</sup>, corrobora no sólo la expresión común de estos, sino también su inmunorrelevancia.

El fuerte reconocimiento de los antígenos proteicos altamente conservados ubicados en la zona de 35-36 kDa, pudiera corresponderse con las proteínas no expuestas en la superficie del microorganismo como la lipoproteína LipL36 y las proteínas flagelares de 35 y 36 kDa (Kelson J y cols., 1998).

No fue posible identificar el reconocimiento de antígenos proteicos con pesos moleculares inferiores a 25 kDa dado el gran reconocimiento del LPS en esta zona, por lo que queda enmascarado el reconocimiento de las proteínas de bajo peso molecular.

## DISCUSIÓN GENERAL

---

Los rendimientos celulares obtenidos para cada una de las cepas de leptospiras seleccionadas, así como la excelente viabilidad de los microorganismos y su alta virulencia en el modelo animal empleado, demostraron su estabilidad en el medio de mantenimiento durante los diferentes subcultivos realizados en las condiciones controladas de laboratorio seleccionadas durante el estudio y en los medios de conservación. Estos resultados, traducidos en rendimientos celulares  $7,6 \times 10^8$  fueron cercanos y en ocasiones superiores a los reportados por otros autores:  $5 \times 10^7$  -  $6 \times 10^8$  células/mL, vacuna israelí (1973);  $3,3 \times 10^9$  células/mL, vacuna Torney EUA (1974);  $2,5 \times 10^9$  células/mL, vacuna china (1984). Estos resultados garantizaron la elaboración de lotes de antígenos para la producción de las preparaciones vacunales.

Además, las cepas conservaron sus potencialidades desde el punto de vista inmunológico como: su antigenicidad, inmunogenicidad y su carácter protectogénico en los animales inmunizados. Por ello, se cuenta con cepas virulentas que, según plantean González M y cols. (1997); Fajardo E y cols. (1998) y González M y cols. (2004), son las indicadas para ser usadas en formulaciones vacunales y en los ensayos de reto o potencia.

Las vacunas contra la leptospirosis deben ser seguras y eficaces, siendo consideradas aceptables aquellas con más de un 70% de protección (WHO, 2003a, González Y y cols., 2004; Martínez R y cols., 2004 y Obregón A y cols., 2007). De ahí que los resultados de protección alcanzados con las preparaciones vacunales estudiadas, reafirman la utilidad de las cepas seleccionadas como candidatas vacunales en una vacuna antileptospirósica. No obstante, se hace necesario profundizar en la evaluación preclínica y en ensayos clínicos de preparaciones vacunales que incluyan al serogrupo Ballum. Anterior a este trabajo no se contaba, en Cuba, con cepas de este serogrupo, seleccionadas y caracterizadas, ni tampoco existen cepas del serogrupo Ballum con fines vacunales en otros países. Por lo que se considera que este trabajo aportó las primeras cepas vacunales de su tipo.

Como ya se sabía a partir de la experiencia clínica la vacuna cubana antileptospirósica, confirió también en el modelo animal usado, una significativa protección con una, dos dosis y varias diluciones de la vacuna frente al reto con las cepas de Ballum, sin embargo el suero proveniente de hámsteres y humanos inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, respectivamente, fue capaz de conferir una alta protección a los animales, mientras que la dilución 1/2 confirió sólo una protección parcial. La protección conferida por vax-SPIRAL<sup>®</sup>, es parcial en la experiencia clínica y también en nuestro modelo lo cual corroboró la necesidad de Ballum en la protección activa.

A pesar de ser notablemente alta la protección heteróloga conferida por vax-SPIRAL<sup>®</sup> contra el serogrupo Ballum en nuestra práctica clínica, con un amplio uso de esta vacuna en el país, se ha podido constatar fallos en la protección específicamente frente a este serogrupo, por ejemplo en el estudio de efectividad conducido en Holguín entre agosto del 1996 y julio de 1997 y que involucró a 118 013 personas de grupos de riesgo, se produjeron en total 217 casos de enfermos y sólo 30 en los vacunados, lo que arrojó un resultado de 97 % de efectividad de la vacuna; valor que se incrementa si se tiene cuenta sólo los casos de leptospira homólogas a las cepas vacunales. El mayor porcentaje de fallos vacunales ocurrió precisamente frente a cepas del serogrupo *Ballum*. Igualmente en el estudio controlado que se realizó en Villa Clara, y que involucró a 101 832 voluntarios bajo un diseño a doble ciegas y con un grupo control, la eficacia fue de 78.1 %, con una fracción prevenible poblacional de 83%. Lo cual corrobora y reafirma los estudios de Holguín. Dentro de los fallos vacunales el mayor porcentaje lo aportaron casos en los cuales se aisló una cepa del serogrupo Ballum.

De acuerdo con las observaciones anteriores del proyecto de vacuna antileptospirósica, y las resultantes del presente estudio, cuando se dispone de cepas seleccionadas por su gran potencial patogénico y virulento a partir de aislamientos autóctonos, se ha podido corroborar en el modelo Hámster Sirio un alto nivel de protección cruzada conferida por vax-SPIRAL<sup>®</sup>. Sin embargo, al afinar los resultados y diluir los sueros de los animales inmunizados sólo en 1/2, se observa una protección parcial. Esto corrobora lo observado en la clínica, que la protección cruzada frente a Ballum es sólo parcial y por lo tanto se justifica

el disponer de cepas vacunales adecuadas de este serogrupo para decidir futuras formulaciones que la contengan.

Este estudio corroboró también el potencial de reactivación o búster que confieren las formulaciones monovalentes contra todos los serovares incluidos en la formulación de vax-SPIRAL<sup>®</sup>, además de la homologa, lo cual da otra alternativa al poder ser considerada sólo como un refuerzo.

También el presente trabajo evidenció y fundamentó el origen de la protección cruzada frente a Ballum originada por los serovares presentes en vax-SPIRAL<sup>®</sup> y como recíprocamente las monovalentes de Ballum refuerzan la protección de otros serovares, todo lo cual tiene valor para las decisiones futuras.

Según el criterio de algunos investigadores (Branger et al., 2001; Fitzgerald et al., 2009; Chagas-Junior et al., 2009), el éxito de las vacunas contra la leptospirosis humana depende de la selección de las cepas, algo que se logra con la correcta identificación de los serovares circulantes y de los estudios de seroprevalencia asociados con los diferentes grupos de riesgo en los humanos y en los reservorios de la enfermedad (Koizumi et al., 2009c).

## VI. CONCLUSIONES

---

1. La adecuada selección y caracterización microbiológica realizada en los aislamientos de leptospiras investigados, permitió disponer de dos cepas del serogrupo Ballum, caracterizadas por una elevada virulencia, patogenicidad, estabilidad en los cultivos, así como un nivel de comunidad antigénica con las cepas vacunales de vax-SPIRAL<sup>®</sup> que asegura un mutuo reforzamiento antigénico y protectogénico a la vez que se amplía el espectro.
2. Los preparados vacunales monovalentes obtenidos a partir de las dos cepas del serogrupo Ballum seleccionadas, mostraron una significativa inmunogenicidad y capacidad de protección homóloga. La protección heteróloga fue significativa frente al serogrupo Canicola, mientras que la inmunización con la vacuna monovalente del serogrupo Ballum usada sólo como búster en los animales previamente inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> reforzó la inmunidad frente a los cinco serogrupos de *Leptospira* estudiados.
3. La vacuna antileptospirósica, vax-SPIRAL<sup>®</sup>, confirió una significativa protección con una, dos dosis y varias diluciones de la vacuna frente al reto con las cepas de Ballum, sin embargo el suero proveniente de hámsteres y humanos inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, respectivamente, fue capaz de conferir una protección significativa en los animales, mientras que, la dilución 1/2 confirió una protección parcial. La protección conferida por la formulación de vax-SPIRAL<sup>®</sup> es parcial en la experiencia clínica y también en nuestro modelo lo cual corrobora la necesidad de Ballum en la protección activa.
4. Se evidenció que la protección cruzada conferida por vax-SPIRAL<sup>®</sup> frente al serogrupo Ballum, correspondió al serogrupo Canicola y en menor cuantía al serogrupo Icterohaemorrhagiae, lo cual puede tener interés al decidir formulaciones vacunales en el futuro.
5. El suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> reconoció antígenos importantes de la membrana de *Leptospira* como las proteínas de 32, 41, 45, 48 kDa y las proteínas flagelares de 35-36 kDa. Lo cual aporta marcadores de seguimiento de la consistencia vacunal y para futuros desarrollos.

## VII. RECOMENDACIONES

---

1. Obtener y optimizar un medio libre de proteínas que permita sustentar a escala productiva un buen crecimiento de las cepas del serogrupo Ballum, sin afectar su virulencia, antigenicidad e inmunogenicidad.
2. Realizar estudios moleculares para la identificación de epítopes protectogénicos conservados entre estos serogrupo/serovares de *Leptospira*.
3. Profundizar en la evaluación preclínica y en ensayos clínicos de preparaciones vacunales que incluyan al serogrupo Ballum.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Adler B, Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J Hyg Camb* 1980a;84:1-10.
2. Adler B, Faine S, Muller H, Green D. Maturation of humoral immune response determines the susceptibility of guinea pigs to leptospirosis. *Pathol.* 1980b;12:529-538.
3. Adler B, de la Peña M. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 2009;(2):4382-4392.
4. Agampodi S, Peacock S, Thevanesam V. The potential emergence of leptospirosis in Sri Lanka. *Lancet Infect Dis* 2009;9(9):524-6.
5. Alfaro C, Aranguren Y, Clavijo A. Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis como fundamentos para el diseño de estrategias de control. *Revista Digital CENIAP HOY* [seriada en línea] 2004 sep-dic;(6): Disponible en: URL: [http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaro\\_c/arti/alfaro\\_c.htm](http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaro_c/arti/alfaro_c.htm). Consultado Enero, 2009.
6. Alpar H, Bramwell V. Current status of DNA vaccines and their route of administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002;19:307-383.
7. Alves V, Gayotto C, Yasuda P, Wakamatsu A, Kanamura C, De Brito T. Leptospiral antigens (*L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae) in the kidney of experimentally infected guinea pigs and their relations to the pathogenesis of the renal injury. *Exp Pathol* 1991;42:81-93.
8. Alves V, Gayotto C, De Brito T, Telma M, Santos A, Wakamatsu M, et al. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pigs and their relations to the morphogenesis of the liver damage. *Exp Toxic Pathol* 1992;44:425-434.
9. Andre-Fontaine G. Canine leptospirosis—do we have a problem? *Vet Microbiol* 2006;117:19-24.
10. Ahmed N, Devi S, Valverde M, Vijayachari P, Machangu R, Ellis W, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2006;5:28.
11. Araceli B. Aspectos clínico epidemiológicos sobre la mortalidad por leptospirosis. Ciudad de La Habana, 2005-2006. [Tesis de Maestría]. La Habana, Cuba: Instituto Medicina Tropical “Pedro Kouri”; 2008.

12. Athanazio D, Silva E, Santos C, Rocha G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica*. Short communication, 2008;(105):176-180.
13. Babudieri B, Castelli M, Pisoni F. Comparative test with formalized and irradiated vaccines against leptospirosis. *Bull Wld Hlth Org* 1973;48:587-590.
14. Ballard S, Williamson M, Adler B, Vinh T, Faine S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. *J Med Microbiol* 1986;21:59-67.
15. Ballard S, Segers R, Bleumink-Pluym N, Fyfe J, Faine S, Adler B. Molecular analysis of the hsp (groE) operon of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Mol Microbiol* 1993;8:739-751.
16. Ballard S, Go A, Segers R, Adler B. Molecular analysis of the dnaK locus of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Gene* 1998;216:21-29.
17. 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;67:853-861.
18. Barroso J. "Aspectos de importancia clínico epidemiológica en la morbilidad por leptospirosis. Ciudad de La Habana, 2005-2006". [Tesis de Maestría]. La Habana, Cuba: Instituto Medicina Tropical; 2008.
19. Bedevia A. Disminuye en grupos de riesgo cifras de morbilidad por *Leptospira*. *Boletín epidemiológico semanal del IPK* 1999;9(32):49.
20. Berdasquera D, Rodríguez I, Obregón A, Fernández C, Segura R, Bustabad E, et al. Brote de leptospirosis humana en la provincia Guantánamo. *Rev Cubana Med Trop* 2007a;59(1):1-5.
21. Berdasquera D. Factores climáticos y transmisión de la leptospirosis en Cuba. *Rev Biomed* 2007b;18:77-78.
22. Berdasquera D, Barroso J, Barreras B, Pérez A, Pérez K, Obregón AM, et al. Factores asociados a la morbilidad por leptospirosis humana. Ciudad de La Habana, 2005-2006. Aprobado *Rev Panam Infectol* 2009;11(1):10-16.
23. Berg H, Bromley D, Charon N. Leptospiral motility. En Stanier RY, Rogers HJ, Ward JB, editores. *Relations between structure and function in the prokaryotic cell*. 28th

Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press; 1978. p. 285-294.

24. Berlioz-Arthaud A, Kiedrzyński T, Singh N, Yvon J, Roualen G, Coudert C, et al. Multi-centre survey of incidence and public health impact of leptospirosis in the Western Pacific. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2007;101:714-721.
25. Bernasovskaia E, Kondratenko V, Melnitskaia E. The connection of the antigenic activity of *Leptospira* to its virulence. *Mikrobiol Z* 1994;56(6):46-50.
26. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;3(12):757-771.
27. Biswas D, Roy S, Vijayachari P, Sugunan A, Nararajaseenivasan K, Sehgal S. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of *Leptospira* in Andaman Islands, India *J Med Res* 2005;121:151-158.
28. Bomfim M, Koury M. Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Vet Microbiol* 2006;118(3-4):278-88.
29. Bomfim M, Barbosa-Stancioli E, Koury M. Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet J* 2008;178(2):251-6.
30. Boonyod D, Poovorawan Y, Bhattarakosol P, Chirathaworn C. LipL32 an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2005;23(2-3):133-41.
31. Bourhy P, Louvel H, Saint Girons I, Picardeau M. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. *J Bacteriol* 2005;187:3255-3258.
32. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, et al. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun* 2001;69(11):6831-6838.
33. Brenner D, Kaufmann A, Sulzer K, Steigerwalt A, Rogers F, Weyant R. 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;49:839-858.

34. Brown J, LeFebvre R, Pan M. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 1991;59:1772-1777.
35. Brown P, Gravekamp C, Carrington D, van de Kemp H, Hartskeerl R, Edwards C, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 1995;43:110-114.
36. Budieno E, Sumardi R, Riyanto B, Hisyam B, Hartopo A. Pulmonary involvement predicts mortality in severe leptospirosis patients. *Acta Med Indones* 2009;41(1):11-4.
37. Bulach D, Kalambaheti T, de la Pena-Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2(4):375-380.
38. Bulach D, Zuerner R, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen P, et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103:14560-14565.
39. Burnette W. Western blotting: Electrophoretic transfer of protein from Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1980;112:192-200.
40. Cachay E, Vinetz J. A global research agenda for Leptospirosis. *J Postgrad Med* 2005;51:174-8.
41. Capó M. Bioética Animal: Desarrollo de un Concepto. *Animales de Experimentación. La Revista Hispanoamericana* 1999;5(2):30-40.
42. Castillo F. El ratón como animal de laboratorio. La Habana, Cuba: Ed. Ciencias Médicas; 1985. 212 p.
43. CDC. Leptospirosis 2009 [19/06/2009]. Disponible en: [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/leptospirosis\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/leptospirosis_g.htm). Consultado Diciembre 2009.
44. Chang Y, Chen C, Palaniappan R, He H, McDonough S, Barr S, et al. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. *Vaccine* 2007;25(48):8190-7.
45. Chapman A, Faine S, Adler B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalent hardjo/pomona leptospiral vaccine. *FEMS Microbiol Immunol* 1990;64:111-118.

46. Chapman A, Everard COR, Faine S, Adler B. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. *Epidemiol Infect* 1991;107:143-155.
47. Chaudhry R, Pandey A, Chandel D, Dhawan B, Gupta D. Pulmonary involvement in leptospirosis: a diagnostic enigma. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2009;51(1):53-5.
48. Chen T. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann Immunol Hung* 1986;26:125-151.
49. Choy H, Kelley M, Chen T, Moller A, Matsunaga J, Haake D. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* 2007;75:2441-2450.
50. Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, et al. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994- and 1996, *Eur J Epidemiol* 2000;16:79-86.
51. Cinco M, Delneri D, Banfi E. Immunodominant antigens recognized by the human immune response to infection by organisms of the species *Leptospira interrogans* serogroup Australis. *FEMS Microbiol Immunol* 1992;89:287-298.
52. Cinco M, Domenis R, Perticarari S, Presani G, Marangoni A, Blasi E. Interaction of leptospires with murine microglial cells. *New Microbiol* 2006;29(3):193-9.
53. Cole J, Sulzer C, Pursell A. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 1973;5:65-69.
54. Colleen L, Lee S, Philip W. Leptospirosis: An emerging disease in travellers, *Travel Medicine and Infectious Disease* 2010;xx:1-7.
55. Corney B, Slack A, Symonds M, Dohnt M, McClintock C, Gowan M, Smythe LD. *Leptospira weilii* serovar Topaz, a new member of the Tarassovi serogroup isolated from a bovine source in Queensland, Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2249-2252.
56. Croda J, Figueira C, Wunder E, Santos C, Reis M, Ko AI, et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira*: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun* 2008;76:5826-5833.
57. Cruz R, Gandul L, Oliver M, Machado O, Obregón A, Álvarez R, et al. Programa Nacional de Prevención y Control de Leptospirosis Hunama (segunda versión) MINSAP. 1998.

58. Cullen P, Cordwell S, Bulach D, Haake D, Adler B. Global Analysis of Outer Membrane Proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002;70(5):2311-2318.
59. Cullen P, Haake D, Bulach D, Zuerner R, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2003;71: 2414-2421.
60. Cullen P, Haake D, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Reviews* 2004;28:291-318.
61. Cullen P, XU X, Matzunaga J, Sanches Y, Ko AI, Haake D, et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 2005;73(8):4853-63.
62. Dai B, Chen Z, Yan H, Zhao H, Li S. PCR amplification, molecular cloning, DNA sequence analysis and immuno/protection in BALB/C mice of the 33 kDa endoflagellar protein of *Leptospira interrogans* serovar lai. *Chin Med Sci J* 1997;12(1):15-21.
63. Dain A, Rozinov M, Holzmayer T, Gershanovich V, Chernukha Y. Cloning and the expression of the hemolysin gene of *Leptospira Pomona pomona* in *Escherichia coli*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1985;6:33-35.
64. De Brito T, Prado M, Negreiros V, Nicastri A, Sakata E, Yasuda P, et al. Detection of leptospiral antigen (*L. interrogans* serovar *copenhageni* serogroup *Icterohaemorrhagiae*) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea pigs. *International Journal of Experimental Pathology* 1992;73:633-642.
65. Delgado F, Brihuega B, Venzano A. Adaptación de un protocolo de inmunohistoquímica para la detección de *Leptospira* spp. en muestras de tejido fijado en formaldehído. *Rev Cubana Med Trop* [seriada en línea]. 2007;59(1). Disponible en: URL:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602007000100003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100003&lng=es&nrm=iso) Consultado Enero, 2009.
66. De la Pena-Montezuma A, Bulach D, Adler B. Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpeterseni*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31:73-81.
67. Del Real G, Segers R, Van Der Z, Gaastra W. Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun* 1989;57:2588-2590.
68. Dong H, Hu Y, Xue F, Sun D, Ojcius D, Mao Y, et al. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC Microbiol* 2008;8:223.

69. Doungchawee G, Sirawaraporn W, Icksang-Ko A, Kongtim S, Naigowit P, Thongboonkerd V. Use of immunoblotting as an alternative method for serogrouping *Leptospira*. *J Med Microbiol* 2007;56:587-592.
70. Duttmann C, Jirón W, Montoya A, Vallecillor, Luna L, Guerrero G. Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis en animales domésticos en Nicaragua (2006-2008). *Leptospirosis Habana 2008, IV Reunión Científica, 12-14 de Mayo de 2008, Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba.*
71. Ellinghausen H, McCullough W. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. *Am J Vet Res* 1965;28:39-44.
72. Ellis W, Hovind-Hougen K, Moller S, Birch-Andresen A. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1983;A255:323-335.
73. Ellis T., Imrie A., Katz A., Effler P. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001-2002. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;8(4):541-7.
74. European Pharmacopeia, 3th Ed. 1997. *Leptospira* vaccine for veterinary use; monograph N° 447:1086.
75. Everard C, Edwards C, Everard J, Carrington D. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. *Eur J Epidemiol* 1995;11(3):311-20.
76. Everard J. Leptospirosis. En: F. E. G. Cox, editor. *The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases*. London, U.K.: The Wellcome Trust; 1996. p. 111-119, 416-418.
77. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: W.H.O; 1982.
78. Faine S. *Leptospira* and leptospirosis. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1994.
79. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: Edit MediSci;1999.
80. Faisal S, Yan W, Chen C, Palaniappan R, McDonough S, Chang Y. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine* 2008;26:277-287.
81. Faisal S, Yan W, McDonough S, Chang Y. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a

- robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine* 2009a;27(3):378-387.
82. Faisal S, Yan W, McDonough S, Mohammed H, Divers T, Chang Y. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. *Vaccine*. 2009b;27(44):6129-36.
83. Fajardo E, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, et al. Estandarización de la dosis 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Cub Med Trop*, 1998;50(1):22-26.
84. Feng C, Li Q, Zhang X, Dong K, Hu B, Guo X. Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against leptospira Braz. *J Med Biol Res Online Ahead of Print* 2009.
85. Fernández C, Zamora Y, Rodríguez J, Obregón A, Rodríguez I. Diagnóstico de Leptospirosis humana por PCR en casos de fallecidos. Leptospirosis Habana 2008, IV Reunión Científica, 12-14 de Mayo de 2008, Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba.
86. Fernández Y, Pérez Y, Aranguren Y, González A, Padrón MA, Valdés Y. Solubilización de componentes de membrana externa de *Leptospira interrogans* serovar mozdok mediante desoxicolato de sodio y tritón X-100 y evaluación de su capacidad inmunogénica y protección homóloga y heteróloga inducida en hámsters. *Rev Cub Med Trop* 2005;57(1):53-54.
87. Ferro B, Rodríguez A, Pérez M, Travi B. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomédica* 2006;26(2):50-59.
88. Flannery B, Costa D, Carvalho F, Guerreiro H, Matsunaga J, Silva E, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3303-3310.
89. Fletcher W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1928;21:265-282.
90. Gamberini M, Gomez R, Atzingen M, Martins E, Vasconsellos S, Romero E, et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potencial vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 2005;244(2):305-13.

91. González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, et al. Vacuna Antileptospirosis Trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de reactividad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios sanos. *VacciMonitor* 1997;6(12):2-10.
92. González M, Rodríguez Y, González A, Medina R, Batista N, Ferriol X, et al. Estudio de la protección pasiva inducida por el suero de vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> (Vacuna antileptospirosis trivalente) en hámsters frente al reto con cepas virulentas de *Leptospira canicola*, *copenhageni* y *mozdok*. *VacciMonitor* 2001;10(3):1-6.
93. González A, Batista N, Valdés Y, González M. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar *mozdok* en medio EMJH modificado. *Rev Cub Med Trop* 2002a;54(1):32-6.
94. González A, Batista N, Ortiz M, Torres V, Infante J, González M. Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes contra *Leptospira interrogans*. *VacciMonitor* 2002b;11(3):6-10.
95. González A. Evaluación de la potencialidad vacunal de dos cepas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. [Tesis de Maestría]. La Habana, Cuba: Instituto Finlay; 2003a.
96. González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, Nuñez J, González M. Inmunogenicidad y capacidad protectora en hámster de preparaciones vacunales monovalentes de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Biotecnología Aplicada* 2003b;20:222-227.
97. González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, González M. Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *L. interrogans* serogrupo ballum. *Rev Cub Med Trop* 2003c;53(3):146-152.
98. González M, Martínez R, Cruz R, Infante J, González I, et al. Vax-SPIRAL<sup>®</sup>. Vacuna antileptospirosis trivalente para uso humano, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. *Biotecnología Aplicada* 2004;2(2):107-111.
99. Gouveia E, Metcalfe J, de Carvalho A, Aires T, Villasboas-Bisneto J. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* [seriada en línea]. 2008 Mar;14(3). Disponible en: URL:<http://www.cdc.gov/EID/content/14/3/505.htm> . Consultado Enero, **2009**.

100. Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 2008;90:660-668.
101. Grooms D. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 2006;66:624-628.
102. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001;69(8):4958-4968.
103. Haake D, Walker E, Blanco D, Bolin C, Miller J, Lovett M. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun* 1991;59(3):1131-1140.
104. Haake D, Martinich C, Summers T, Shang E, Pruetz J, McCoy A, et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: Downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* 1998;66(4):1579-1587.
105. Haake D, Mazel M, McCoy A, Milward F, Chao G, Matsunaga J, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 1999;67:6572-6582.
106. Haake D, Chao G, Zuerner R, Barnett J, Barnett D, Mazel M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000;68:2276-2285.
107. Haake D, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002;70(9):4936-45.
108. Haake D, Matsunaga J. Leptospiral membrane proteins-variation on a theme? *Indian J Med Res* 2005.
109. Haga Y, Ogino S, Ohashi S, Ajito T, Hashimoto K, Sawada T. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *J Vet Med Sci* 1997;59:115-120.
110. Hauk P, Macedo F, Romero E, Vasconcellos S, De Moraes Z, Barbosa A, et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun* 2008;76:2642-2650.

111. Herrmann J, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol* 1992;30:1696-1702.
112. Hoke D, Egan S, Cullen P, Adler B. LipL32 Is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun* 2008;76:2063-2069.
113. Holk K, Neilsen S, Ronne T. Human leptospirosis in Denmark 1970-1996: an epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis* 2000;32:533-538.
114. Hsie W, Chang Y, Chen C, Pan M. Omp52 is a growth-phase-regulated outer membrane protein of *Leptospira santarosai* serovar *shermani*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243(2):339-45.
115. Hubener E, Reiter H. Beitrage zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr* 1915;41:1275–1277.
116. Infante J, Sifontes S, Sierra G, Campa C. Los biomodelos aplicados al desarrollo de vacunas y sueros en el Instituto Finlay. *Rev Hisp Anim Exp* 1998;3(3):30-40.
117. Instituto Finlay. Registro Médico-Sanitario vax-SPIRAL<sup>®</sup> (Vacuna antileptospirósica trivalente), 1998.
118. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:1049-1050.
119. Jane A, Schenberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerging Infect Dis* 2005;11:1048-54.
120. Johnson R, Harris V. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperature. *J Bacteriol* 1967;94:27-31.
121. Johnson R, Walby J, Henry R, Auran N. Cultivation of parasitic leptospires: Effect of pyruvate. *Appl Microbiol* 1973;26(1):118-119.
122. Johnson R, Faine S. En: Krieg N, Holt J. editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins; 1984. p. 62–67. (vol 1).
123. Jost B, Adler B, Vihn T, Faine S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J Med Microbiol* 1986;22:269-275.
124. Jost B, Adler B, Faine S. Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol* 1989; 29:115-120.

125. Kelson J, Adler B, Chapman A, Faine S. Identification of leptospiral flagellar antigens by gel electrophoresis and immunoblotting. *J Med Microbiol* 1988;26:47-53.
126. Ko A, Galvao R, Ribeiro C, Johnson J, Riley L. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 1999;354(9181):820-5.
127. Ko A, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonótica pathogen *Nature* 2009;7:736-747.
128. Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett* 2003a;226(2):215-19.
129. Koizumi N, Watanabe H. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp.that reacted with convalescent mice sera. *J Med Microbiol* 2003b;52 (Pt7):585-9.
130. Korthof G. Experimentelles schlammfieber beim menschen. *Zentr Bakteriell Parasitenk Abt I Orig A* 1932;125:429.
131. 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.
132. Kupek E, de Sausa M, de Sausa J. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil 1991-1996. *Braz J Infect Dis* 2000;4:131-134.
133. Landouzy L. Fièvre bilieuse ou hépatique. *Gaz. Hôpital* 1883a;56:809.
134. Landouzy L. Typhus hépatique. *Gaz. Hôpital* 1883b;56:913.
135. Laras K, Cao B, Bounlu K, Nguyen T, Olson J, Thongchanh S, et al. The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:278-286.
136. Lee S, Kim A, Park G, Seong I, Kim M, Lee Y, et al. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene* 2000;254(1-2):19-28.
137. Lee S, Kim S, Park S, Kim M. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun* 2002;70(1):315-322.
138. Levett P. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):296-326.
139. Levett P. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2003;36:447-452.
140. Levett P, Morey R, Galloway R, Turner D, Steigerwalt A, Mayer L. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005a;54:45-49.

141. Levett P, Morey R, Galloway R, Steigerwalt A, Ellis W. Reclassification of *Leptospira parva* Hovind-Hougen et al, 1982 as *Turneriella parva* gen.nov, comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005b;55:1497-1499.
142. Levett P, Morey R, Galloway R, Steigerwalt A. *Leptospira broomii* sp. nov, isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:671-673.
143. Luo Y, Yan J, Mao Y, Li S. Determination of the genus-specific antigens in outer membrane proteins from the starins of *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* with different virulence. *Zhejiang Univ Sci* 2004;5(4):462-6.
144. Madigan M, Martinko J, Parker J, Brock T. *Biología de los Microorganismos*. Madrid, Prentice Hall Iberia, 1999,p. 149-177.
145. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. *J Clin Microbiol* 2005;43:539-545.
146. Malajov Y, Panin A, Sovoliova G. *Leptospirosis de los animales*. 3ra. ed. La Habana: Editorial Ciencias Medicas;2007. p. 24-53.
147. Man Kala. *Leptospirosis humana*. (Tesis de terminación de residencia en microbiología). La Habana, Cuba: Instituto Medicina Tropical “Pedro Kouri”; 1992.
148. Maneewatch S, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Klaysing B, Tongtawe P. OmpL1 DNA vaccine cross-protects against heterologous *Leptospira* spp. Challenge. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2007;25(1):75-82.
149. Martínez R, Cruz R, López C. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 1993;45:32-41.
150. Martínez R, Pérez A, Baró M, Alvarez M, Menéndez J, Díaz M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Cub Med Trop* 1998;50(2):159-166.
151. Martínez R, Pérez A, Baró M, Alvarez M, Menéndez J, Díaz M, et al. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. *Rev Panam Salud Publica* 2000;8(6):385-392.
152. Martínez R, Pérez A, Quiñones M, Cruz R, Álvarez A, Armesto M, et al. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Panam Salud Pública* 2004;15:249-55.

153. Masuzawa T, et al. Protective activity of glycolipid antigen against infection by *Leptospira interrogans* serovar canicola. *J Gen Microbiol* 1990a;136(2):227-30.
154. Masuzawa T, Nakamura R, Hashiguchi Y, Shimizu T, Iwamoto Y, Morita T, et al. Immunological reactivity and passive protective activity of monoclonal antibodies against protective antigen (Pag) of *Leptospira interrogans* serovar lai. *Zentbl Bakteriol Reihe A* 1990b;272:328-336.
155. Matsunaga J, Young T, Barnett J, Barnett D, Bolin C, Haake D. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun* 2002;70(1):323-334.
156. Matsunaga J, Barocchi M, Croda J, Young T, Sanchez Y, Siqueira I, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecul Microbiol* 2003;49:929-946.
157. McBride A, Athanazio D, Reis M, Ko A. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:376-386.
158. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 1995;172:281-285.
159. Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun* 1997;65(2):729-738.
160. Merien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;185:17-22.
161. Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived conjugates from *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol* 1990;33(3):199-204.
162. Ministry of Health of the People's Republic of China. 2008; Disponible en: URL: [<http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/wsb/index.htm>] Consultado en Enero 2010.
163. Ministerio de Salud Pública. Subdirección de Epidemiología. Boletín Epidemiológico Semanal, Inst Med Trop "Pedro Kouri" 1991;1(52):409.

164. Ministerio de Salud Pública. Subdirección de Epidemiología. Boletín Epidemiológico Semanal, Inst Med Trop “Pedro Kouri” 1992;1(53):315.
165. Ministerio de Salud Pública. Subdirección de Epidemiología. Boletín Epidemiológico Semanal, Inst Med Trop “Pedro Kouri” 1993;1(60):512.
166. Mohan A, Cumberbatch A, Adesiyun A, Chadee D. Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996–2007: A retrospective study. *Acta Tropica* 2009;112:260-265.
167. Mood A, Graibill F. Introducción a la teoría estadística. Madrid: Ediciones Aguiar; 1978.
168. Moore G, Guptill L, Glickman N, Caldanaro R, Aucoin D, Glickman L. Canine leptospirosis, United States, 2002-2004. *Emerg Infect Dis* 2006;12(3):501–3.
169. Morey R, Galloway R, Bragg S, Steigerwalt A, Mayer L, Levett P. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2006;44:3510-3516.
170. Mor G, Eliza M. Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. *Mol Biotechnol* 2001;19:245-250.
171. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover F. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th Ed. American Society for Microbiology: Washington D.C.;1995.
172. Murray G, Ellis K, Lo M, Adler B. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes and Infection* 2008;10:791-797.
173. Murray G, Srikrishnan A, Henry R, Puapairoj A, Sermswan R, Adler B, et al. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes and Infection* 2009a;11:311-314.
174. Murray G, Srikrishnan A, Hoke D, Wunder E, Henry R, Lo M, et al. The major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2009b;77:952-958.
175. Naiman B, Alt D, Bolin C, Zuerner R, Baldwin C. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *Infect Immun* 2001;69(12):7550-7558.
176. Naiman B, Blumberg 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):6147-6157.
177. Nally J, Artiushin S, Timoney J. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of *Leptospira interrogans*. Infect Immun 2001;69:7616-7624.
  178. Nally J, Chow E, Fishbein M, Blanco D, Lovett M. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. Infect Immun 2005a;73(6):3251-60.
  179. Nally J, Whitelegge J, Aguilera R, Pereira M, Blanco D, Lovett M. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. Proteomics 2005b;5(1):144-52.
  180. Nascimento AL, Ko AI, Martins E, Monteiro-Vitorello C, Ho P, Haake D, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. J Bacteriol 2004a;186:2164-2172.
  181. Nascimento A, Verjovski-Almeida S, Van Sluys M, Monteiro-Vitorello C, Camargo LE, Digiampietri LA, et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Braz J Med Biol Res 2004b;37:459-477.
  182. Navarro F. La Fiebre Biliosa Grave de los países cálidos no es la Fiebre Amarilla [Tesis doctoral]. Annal Acad Cienc Med Fis Nat. Habana; 1968.
  183. Obregón A, 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 Cubana Med Trop 2007;59(1):1-7.
  184. OECD. Organización para la Cooperación Económica y desarrollo. Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio. Medio Ambiente Monográfico No. 45. 1992.
  185. Okuda M, Sakai Y, Matsuuchi M, Oikawa T, Watanabe M, Itamoto K, et al. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant OmpL1 protein. Vet Med Sci 2005;67(3):249-54.
  186. Oliva R, Infante J, González M, Pérez V, Sifontes S, Marrero O, et al. Pathological-clinical characterization of leptospirosis in a golden Syrian hamster model. Arch Med Res 1994;25(2):165-170.

187. Oliva R, Infante J, González M, González I, Fariñas M, et al. Comparación clínico-patológica de la leptosirosis, en hámster sirio o dorado y el curiel Ducan Hartley mediante la infección experimental con tres serovares de *L. interrogans*. *VacchiMonitor* 1998;7(5):8-13.
188. Oliveira D, Guimaraes M, Portugal J, Medeiros Z. The sociodemographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 2009;103(2):149-57.
189. OPS. Organización Panamericana de la Salud. Principales enfermedades infecciosas en Centroamérica durante 1998, antes y después del Mict. *Rev Panam Salu Pública* 1999;6(6):1-30.
190. OPS. Organización Panamericana de la Salud. 14<sup>a</sup> Reunión Interamericana a nivel Ministerial en Salud y Agricultura. Las enfermedades desatendidas en las poblaciones postergadas, con énfasis en las zoonosis. 2005; Disponible en: URL: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/rimsa14-18-s.pdf>. Consultado Enero, 2009.
191. OPS. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades desatendidas: Enfermedades de la pobreza. 2009; Disponible en: URL: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/psit-nd-poster.htm>. Consultado Enero, 2009.
192. Palaniappan R, Chang Y, Jusuf S, Artiushin S, Timoney J, McDonough S, et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic Lig A protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2002;70(11):5924-5930.
193. Palaniappan R, McDonough S, Divers T, Chen Ch, Pan M, Matsumoto M, et al. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona Infection. *Infect Immu* 2006;74(3):1745-1750
194. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* 2008;12(4):351-7.
195. Pate G, Hogan M, FitzSimon N, Mellotte G. A review of the epidemiology of leptospirosis in the republic of Ireland. *Ir Med J* 2000;93:114-117.
196. Pavan M, Cairo F, Brihuega B, Samartino L, Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis* 2008; 31:37-45.

197. Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flab results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecul Microbiol* 2001;40:189-199.
198. Picardeau M, Bulach D, Bouchier C, Zuerner R, Zidane N, Wilson P, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2008;3:1599-1607
199. Procedimientos Normalizados de Operación (PNO). Preparación del medio libre de proteínas para los serogrupos Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae (PNO 17-048; 17-049 y 17050). Instituto Finlay; 2002.
200. Que-Gewirth N, Ribeiro A, Kalb S, Cotter R, Bulach D, Adler B, et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* Lipid A: The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J Biol Chem* 2004;279:25420-25429.
201. Ratnam S. A manual on leptospirosis. S.R. Publications: Madras; 1994.
202. Reed L, Muench H. A simple method of estimating the fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-497.
203. Ren S, Fu G, Jiang X, Zeng R, Miao Y, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003;422:888-893.
204. Ristow P, Bourhy P, McBride F, Figueira C, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-Like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathogogens* 2007;3:90-97.
205. Rodríguez I, Obregón A, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2002;40(1):11-5.
206. Rodríguez I, Fernández C, Obregón A, Zamora Y, Rodríguez J, Rodríguez N, et al. Confirmación microbiológica de dos brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 2007;59(1)1-5.
207. Rodríguez-Reyes E, Cullen P, Bulach D, Adler B, Haake D, De la Peña- Moctezuma A. Expresión en *Escherichia coli* del gen *gspD* del sistema de secreción tipo II de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad *Hardjo*. *Rev Cub Med Trop* 2005;57:45-46.

208. Rodríguez I, Fernández C, Obregon A, Zamora Y, Rodríguez J, Rodríguez N, et al. Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis en Cuba (2006-2008). Leptospirosis Habana 2009, VI Reunión Científica, 8-12 de Junio de 2009, Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba.
209. Rohrbach B, Ward D, Hendrix D, Cawrse-Foss M, Moyers T. Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. *Veterinary Ophthalmology* 2005;8:30-36.
210. Roit I. Inmunología. 5ta ed. Barcelona, España: Ediciones Científicas y Técnicas; 2003.
211. Romero E, Bernardo C, Yasuda P. Human leptospirosis: A twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2003;45(5):245-248.
212. Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2006;44:3954-3962.
213. Sandow K, Ramírez W. Leptospirosis. *Veterinaria.org: Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®* [seriada en línea] 2005 Jun; VI(6). Disponible en: URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605.html> Consulta Enero 2009.
214. Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by leptospira vaccination. *Vet Microbiol* 2005;108(1-2):113-118.
215. Secretaría de Salud de Honduras. Programa de Preparativos para Desastres, PS/OMS. Serie Crónicas de Desastres. Huracán Mitch en Honduras 1998. Tegucigalpa M.D. C. Disponible en: URL:Febrero de 1999.
216. Segers R, Van der Drift A, De Nijs A, Corcione P, Van der Zeijst B, Gastra W. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun* 1990;58(7):2177-85.
217. Sehgal S, Sugunan A, Vijayachari P. Leptospirosis: disease burden estimation and surveillance networking in India. *South East Asian J Trop Med Pub Hlth* 2003, 34(suppl 2):170-177.
218. Seixas F, Silva E, Hartwig D, Cerqueira G, Amaral M, Fagundes M, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine* 2007; 26: 88-95.

219. Seng H, Sok T, Tangkanakul W, Petkanchanapong W, Kositanont U, Sareth H, et al. Leptospirosis in Takeo Province, Kingdom of Cambodia, 2003. *J Med Assoc Thai* 2007;90(3):546-51.
220. Shang E, Exner M, Summers T, Martinich C, Champion C, Hancock R, et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun* 1995;63:3174–3181.
221. Shang E, Summers T, Haake D. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 1996;64(6):2322-2330.
222. Shenberg E, Torton M. A new leptospiral vaccine for use in man. I. Development of a vaccine from *Leptospira* grown in a chemically defined medium. *J Inf Dis* 1973;128(5):642-646.
223. Silva E, Brod C, Cerqueira G, Bourscheidt D, Seyffert N, Hartwig D, et al. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. *Vet Microbiol* 2007;121(1-2):144-9.
224. Silva E, Santo C, Athanazio D, Seyffert N, Seixas F, Cerqueira GM, et al. Characterization of virulent *Leptospira* isolates in hamster model. *Vaccine* 2008;26:3892-3896.
225. Silva E, Cerqueira G, Seyffert N, Seixas F, Hartwig D, Brod C, et al. ***Leptospira noguchii*** and human and animal leptospirosis, southern Brazil [letter]. *Emerg Infect Dis* [serial online] 2009 Apr. Disponible en: URL: <http://www.cdc.gov/content/EID/15/4/621.htm>. Consultado Abril, 2009.
226. SISNIVEN. Sistema Nicaragüense de Vigilancia Epidemiológica Nacional. La enfermedad en Nicaragua [en línea]. Mayo de 2008, A Fondo, SEMG. 213-214, Disponible en: URL: <http://www.medicinageneral.org/revista106/pdf/213-214.pdf>. Consultado Febrero, 2009.
227. Slack A, Dohnt M, Symonds M, Smythe L. Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005;4:10.
228. Slack A, Symonds M, Dohnt M, Smythe L. An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison

- with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. *J Med Microbiol* 2006a;55:1549-1557.
229. Slack T, Symonds L, Dohnt M, Smythe L. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004. *Epidemiol Infect* 2006b;1-9.
  230. Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smyth L. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2007;57:361-366.
  231. Slack A, Kalambaheti T, Symonds M, Dohnt M, Galloway R, Steigerwalt A, et al. *Leptospira wolffii* sp. nov, isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2305-2308.
  232. Slack A, Khairani-Bejo S, Symonds M, Dohnt M, Galloway R, Steigerwalt A, et al. *Leptospira kmetyi* sp. nov, isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:705-708.
  233. Smythe L. Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec* 1999;74:237-242.
  234. SNSA. Servicio Nacional de Sanidad Animal Cuba. Disposición 309/2000. Consideraciones éticas para el uso de animales de laboratorio:215:232. (Documento regulatorio), 2000.
  235. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere J, Andre-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 2000;19:86-94.
  236. Spichler A, Vilaça P, Athanazio D, Albuquerque J, Castro B. Predictors of Lethality in Severe Leptospirosis in Urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79(6):911-914.
  237. Stamm L, Gherardini F, Parrish E, Moomaw C. Heat shock response of spirochetes. *Infect Immun* 1991;59:1572-1575.
  238. Stanek J, Henneberry R, Cox C. Growth requirements of pathogenic leptospires. *Infect. Immun.* 1973;7(6):886-897.

239. Steere A, Sikand V, Meurice F, Parenti D, Fikrig E, Schoen R, et al. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. *N Engl J Med* 1998;339:209-215.
240. Stevenson B, Choy H, Pinne M, Rotondi M, Miller M, DeMoll E, et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE* 2007;2:1188.
241. Swain R. The electron-microscopical anatomy of *Leptospira Canicola*. *J Pathol Bacteriol* 1957;73:155–158.
242. Tangkanakul W, Smits H, Jatanasen S, Ashford D. Leptospirosis: An emerging health problem in Thailand. *Southeast Asian J TropMed Pub Hlth* 2005;36:281-288.
243. Terpstra W, Hartskeerl R, Smits H, Korver H. International Course in Laboratory Techniques for the Diagnosis of Leptospirosis. Royal Tropical Institute, Amsterdam, 2000.
244. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe L, Petkanchanapong W, Limpaboon R, et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Neglected Trop Dis* 2007;1:50-56.
245. Thongboonkerd V. Proteomics in leptospirosis research: towards molecular diagnostics and vaccine development. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(1):53-61.
246. Thornley C, Baker M, Weinstein P, Maas E. Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect* 2002;128:29-36.
247. Torton M, Shenberg E, Gerichter C, Neuman P, Klingberg M. A new leptospiral vaccine for use in man II. Clinical and serological evaluation of a field trial with volunteers. *J Infect Dis* 1973;128(5):647-51.
248. Trueba G, Bolin C, Zuerner R. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 1992;174: 4761-4768.
249. Uhlenhuth P, Fromme W. Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). *Med Klin* 1915;44:1202–1203.
250. Vado I, Cárdenas M, Jiménez B, Alzina A, Laviada H, Suárez V, et al. Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44(6):335-40.

251. Valverde M, Ramírez J, Montes de Oca L, Goris M, Ahmed N, Hartskeerl R. Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. *Infect Genet Evol* 2008;8:529-533.
252. Van Butsele. Information concernant la Leptospirose. Medisis 2006.
253. Victoria B, Ahmed A, Zuerner R, Ahmed N, Bulach D, Quinteiro J, et al. Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS ONE* 2008; 3:e2752.
254. Victoriano A, Smythe L, Gloriani-Barzaga N, Cavinta L, Kasai T, Limpakarnjanarat K, et al. Leptospirosis in the Asia Pacific Region. *BMC Infect Dis* 2009;9(1):147-155.
255. Vijayachari P, Sugunan A, Shriram A. Leptospirosis: an emerging global public health problem *J. Biosci* 2008;33(4):557-569.
256. Vinetz J. Leptospirosis. *Curr Open Inf Dis* 2001;14:527-38.
257. Volina E, Levina L, Soboleva G. Phospholipase activity and virulence of pathogenic *Leptospira*. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1986;30:163-169.
258. Wang Z, Jin L, Wegrzyn A. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories* 2007;6:39-46.
259. Weil A. Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Dtsche. Arch Klin Med* 1886;39:209-232.
260. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213–7218.
261. Werts C, Tapping R, Mathison J, Chuang T, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2- dependent mechanism. *Nature Immunol* 2001;2:346-352.
262. WHO. World Health Organization. Who Guidelines on Non-clinical Evaluation of Vaccines 2003a.
263. WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta:2003b
264. WHO: Report of the Brainstorming Meeting on Leptospirosis Prevention and Control. Mumbai, 16-17 February 2006, WHO India and Regional Medical Research Centre, WHO Collaborating Centre for Diagnosis, Research, Reference and Training in Leptospirosis.

265. WHO. National Leptospirosis Surveillance Report Number 17. January- December 2008: WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis [en linea]. September 2009. Disponible en: [http://www.health.qld.gov.au/qhcss/documents/lepto/08\\_annual.pdf;2009](http://www.health.qld.gov.au/qhcss/documents/lepto/08_annual.pdf;2009). Consultado Enero 2010.
266. Wolff J, Malone R, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247:1465-1468.
267. Yang C, Wu M, Pan M, Hsieh W, Vandewalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(8):2037-45.
268. Yan W, Faisal S, McDonough S, Divers T, Barr S, Chang C, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes Infect* 2009;11(2):230-7.
269. Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the envelope vaccine to leptospira. *Chin Med Assoc* 2003;66(4):224-230.
270. Yanagihara Y, Villanueva S, Yoshida S, Okamoto Y, Masuzawa T. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007;30:399-413.
271. Yang J, Zhang Y, Xu J, Geng Y, Chen X. Serum Activity of Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Is a Potential Clinical Marker for Leptospirosis Pulmonary Hemorrhage. *PLoS ONE* 2009;4(1):4176-4181.
272. Zhang Y, Qie M, Zeng X, Cheng J, Wu J, Liu J. The effect of a vaccine made from 39 kd hydrophobic outer membrane protein of *Leptospira interrogans* on neurohumoral and red cell immunity function of guinea pigs. *Hua. Xi. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* 1998; 29 (2):117-121.
273. Zuerner R, Knudtson W, Bolin C, Trueba G. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Microbial Pathog* 1991;10:311-322.

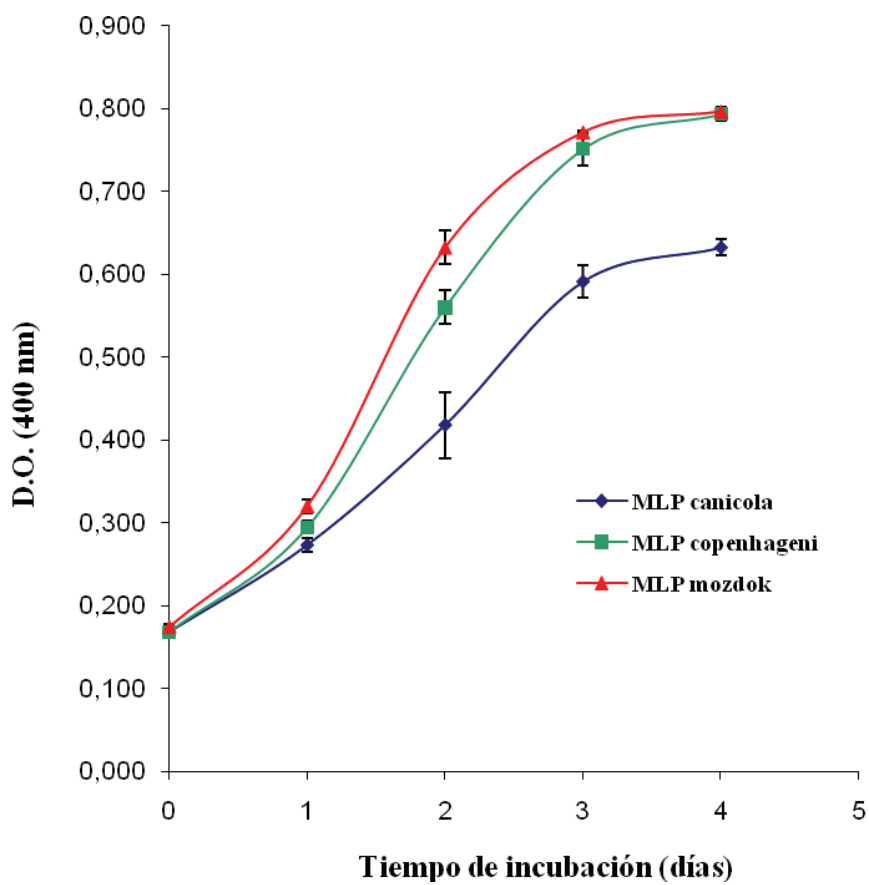
274. Zuerner R, Alt D. Variable nucleotide tandem repeat analysis reveals a unique group of *Leptospira interrogans* serovar pomona isolates associated with California Sea Lions. *J Clin Microbiol* 2009;47:1202-1205.
275. Zúñiga I, Baeza B, Domínguez M, Bernal A, Muñoz W. Leptospirosis posterior a la Inundación en el Estado de Tabasco: Diagnóstico diferencial con dengue hemorrágico y estrategias para controlar el brote. *Leptospirosis Habana 2008*, IV Reunión Científica, 12-14 de Mayo de 2008, Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba.

## ANEXOS

---

**Análisis estadístico para la determinación de correlación entre la dosis de inóculo (volumen de inóculo) y la sobrevivencia (día de las muertes)**

Volumen de inóculo	Días de sobrevivencia	
	Cepa 42600	Cepa 12399
0.05	10	8
0.1	11	6
0.4	7	6
0.8	8	6
Coeficiente de Spearman	$\delta s = -0,6$	$\delta s = -0,77$
probabilidad	0,40	0,22



Curvas de crecimiento seguidas por las cepas vacunales de los serogrupos Canicola, Icterohemorrhagiae y Pomona en medio libre de proteínas bajo el cultivo con condiciones agitadas (30°C y 130 r.p.m.). Se tomaron muestras de los cultivos cada 24 h durante 7 días, la concentración celular se determinó por medición de la absorbancia a 400 nm y conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser.

**Comparación de los niveles de concentración de anticuerpos IgG específicos en hámsteres inmunizados con la vacuna monovalente de Ballum 12399, posterior a la primera y a la segunda dosis con relación a los niveles iniciales, según el método de**

Tiempo (semana)	Concetración de IgG específica (U/mL) para cada antígeno de recubrimiento en el ELISA				
	12399	42600	Canicola	Ictero	Pomona
T <sub>0</sub>	0,105	2,172	6,572	4,783	5,579
T <sub>4</sub>	73,596	47,322	4,419	12,278	6,542
T <sub>7</sub>	193,985	145,570	27,196	20,439	18,286
T <sub>4</sub> /T <sub>0</sub>	700,914	21,787	0,672	2,567	1,172
T <sub>7</sub> /T <sub>0</sub>	1847,476	67,0212	4,138	4,273	3,278
p(T <sub>4</sub> /T <sub>0</sub> )	0,001	0,022			
p(T <sub>7</sub> /T <sub>0</sub> )	0,009	0.012			

**Comparación de los niveles de concentración de anticuerpos IgG específicos en hámsteres inmunizados con la vacuna monovalente de Ballum 42600, posterior a la primera y a la segunda dosis con relación a los niveles iniciales, según el método de**

Tiempo (semana)	Concetración de IgG específica (U/mL) para cada antígeno de recubrimiento en el ELISA				
	12399	42600	Canicola	Ictero	Pomona
T <sub>0</sub>	0,441	3,491	4,533	3,472	5,029
T <sub>4</sub>	17,121	14,067	14,872	4,161	7,085
T <sub>7</sub>	25,877	66,195	16,001	13,951	11,650
T <sub>4</sub> /T <sub>0</sub>	38,823	4,030	3,281	1,198	1,409
T <sub>7</sub> /T <sub>0</sub>	58,678	18,961	3,530	4,018	2,317
p(T <sub>4</sub> /T <sub>0</sub> )					
p(T <sub>7</sub> /T <sub>0</sub> )					

### **Leyenda**

T<sub>0</sub>: antes de la aplicación de la primera dosis

T<sub>4</sub>: cuatro semanas después de aplicada la primera dosis

T<sub>7</sub>: una semanas después de aplicada la segunda dosis (semana 7)

p: probabilidad para la comparación de las concentraciones de IgG específica entre los tiempos dentro del estudio

La concentración de IgG específica para cada tiempo corresponde a la media de los valores individuales de 10 animales.

**Intervalos de confianza para los niveles de seroconversión alcanzados por la variante de vacuna monovalente 12399 para cada uno de los antígenos evaluados por ELISA**

Antígeno de recubrimiento	No. animales que seroconvirtieron	Total de animales	Seroconversión (%)	IC
12399	10	10	100	72,2%-100%
42600	10	10	100	72,2%-100%
Canicola	5	10	50	23,7%-76,3%
Ictero	3	10	30	10,8%-60,3%
Pomona	2	10	20	5,7%-60,0%

**Intervalos de confianza para los niveles de seroconversión alcanzados por la variante de vacuna monovalente 42600 para cada uno de los antígenos evaluados por ELISA**

Antígeno de recubrimiento	No. Animales que seroconvirtieron	Total de animales	Seroconversión (%)	IC
12399	10	10	100	72,2%-100%
42600	9	10	90	60,0%-95,5%
Canicola	5	10	50	23,7%-76,3%
Ictero	2	10	20	5,7%-60,0%
Pomona	1	10	10	0,5%-40,4%

**Leyenda**

IC: Intervalos de confianza para proporciones según método aproximado de Wilsón

Comparación de proporciones entre los animales que seroconvirtieron y los que no para cada variante de vacuna monovalente, según método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Variante de recubrimiento en el ELISA									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC
12399	10	0	10	0	5	5	3	7	2	8
42600	10	0	9	1	5	5	2	8	1	9
p	1		1		1		1		1	

Comparación de proporciones entre los animales que seroconvirtieron y los que no con relación a sus controles para la variante de vacuna monovalente 12399, según método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Variante de recubrimiento en el ELISA									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC
12399	10	0	10	0	5	5	3	7	2	8
Control	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
p	0,0		0,0		0,03		0,21		0,47	

Comparación de proporciones entre los animales que seroconvirtieron y los que no con relación a sus controles para la variante de vacuna monovalente 42600, según método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Variante de recubrimiento en el ELISA									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC	SC	NSC
42600	10	0	9	1	5	5	2	8	1	9
Control	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
p	0,0		0,0		0,03		0,47		1	

#### Leyenda

SC: número de animales que seroconvirtieron

NSC: número de animales que no seroconvirtieron

p: probabilidad para un nivel de significación de 0,05

Comparación de proporciones entre el número de animales sobrevivientes y las muertes para cada variante de vacuna monovalente en el ensayo de protección activa contra aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cinco cepas evaluadas, según el método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Cepa de reto									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV
12399	10	0	9	1	4	6	1	9	1	9
42600	8	2	10	0	2	8	1	9	0	10
p	0,47		1		0,62		1		1	

Comparación de proporciones entre el número de animales sobrevivientes y las muertes para cada variante de vacuna monovalente en el ensayo de protección activa contra aproximadamente 100 DL<sub>50</sub> de las cinco cepas evaluadas, según el método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Cepa de reto									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV
12399	10	0	10	0	5	5	3	7	2	8
42600	10	0	10	0	4	6	2	8	1	9
p	1		1		1		1		1	

#### Leyenda

SV: número de animales que sobrevivieron al reto

NSV: número de animales que no sobrevivieron al reto

p: probabilidad para un nivel de significación de 0,05

Comparación de proporciones entre el número de animales que sobrevivieron al reto y los que no para la variante de vacuna monovalente 12399 con relación a sus controles, en el ensayo de protección activa contra aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cinco cepas evaluadas, según el método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Cepa de reto									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV
12399	10	0	9	1	4	6	1	9	1	9
Controles	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
p	0,0		0,0		0,08		1		1	

Comparación de proporciones entre el número de animales que sobrevivieron al reto y los que no para la variante de vacuna monovalente 42600 con relación a sus controles, en el ensayo de protección activa contra aproximadamente 10 000 DL<sub>50</sub> de las cinco cepas evaluadas, según el método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Cepa de reto									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV
42600	10	0	8	2	2	8	1	9	0	10
Controles	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
p	0,0		0,0		0,47		1		1	

#### Leyenda

SV: número de animales que sobrevivieron al reto

NSV: número de animales que no sobrevivieron al reto

p: probabilidad para un nivel de significación de 0,05

Comparación de proporciones entre el número de animales que sobrevivieron al reto y los que no para la variante de vacuna monovalente 12399 con relación a sus controles, en el ensayo de protección activa contra aproximadamente 100 DL<sub>50</sub> de las cinco cepas evaluadas, según el método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Cepa de reto									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV
12399	10	0	10	0	5	5	3	7	2	8
Controles	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
p	0,0		0,0		0,03		0,21		0,47	

Comparación de proporciones entre el número de animales que sobrevivieron al reto y los que no para la variante de vacuna monovalente 42600 con relación a sus controles, en el ensayo de protección activa contra aproximadamente 100 DL<sub>50</sub> de las cinco cepas evaluadas, según el método exacto de Fisher

Variante de vacuna	Cepa de reto									
	12399		42600		Canicola		Ictero		Pomona	
	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV	SV	NSV
42600	10	0	10	0	4	6	2	8	1	9
Controles	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
p	0,0		0,0		0,08		0,47		1	

#### Leyenda

SV: número de animales que sobrevivieron al reto

NSV: número de animales que no sobrevivieron al reto

p: probabilidad para un nivel de significación de 0,05

**Datos del análisis estadístico en la busqueda de correlación entre protección y seroconversión mediante el coeficiente de correlación de Spearman**

	Dosis de reto 10 000DL <sub>50</sub>			
	Cepa 12399		Cepa 42600	
	Protección (%)	Seroconversión (%)	Protección (%)	Seroconversión (%)
Ballum 12399	100	100	80	100
Ballum42600	90	100	100	90
Canicola	40	50	20	50
Ictero	10	30	10	20
Pomona	10	20	0	10
Coeficiente de correlación de Spearman	$\delta s=0,947$		$\delta s=1$	
Probabilidad	p=0,014		p=0,0	

	Dosis de reto 100DL <sub>50</sub>			
	Cepa 12399		Cepa 42600	
	Protección (%)	Seroconversión (%)	Protección (%)	Seroconversión (%)
Ballum 12399	100	100	100	100
Ballum42600	100	100	100	90
Canicola	50	50	40	50
Ictero	30	30	20	20
Pomona	20	20	10	10
Coeficiente de correlación de Spearman	$\delta s=1$		$\delta s=0,974$	
Probabilidad	p=0,0		p=0,005	

**Leyenda**

$\delta s$ : Coeficiente de correlación de Spearman

p: probabilidad para un nivel de significación de 0,05

Para ambas DL<sub>50</sub> existe una correlación entre protección y seroconversión. A medida que aumenta una, aumenta la otra y viceversa.

**Datos del análisis estadístico en la búsqueda de correlación lineal entre los % de protección y los % de seroconversión mediante el coeficiente de correlación de Pearson**

Dosis de reto 10 000DL <sub>50</sub>				
Cepa 12399		Cepa 42600		
Protección (%)	Seroconversión (%)	Protección (%)	Seroconversión (%)	
Ballum 12399	100	100	80	100
Ballum 42600	90	100	100	90
Canicola	40	50	20	50
Ictero	10	30	10	20
Pomona	10	20	0	10
Coeficiente de correlación de Pearson	$\delta p=0,992$		$\delta p=0,945$	

Dosis de reto 100DL <sub>50</sub>				
Cepa 12399		Cepa 42600		
Protección (%)	Seroconversión (%)	Protección (%)	Seroconversión (%)	
Ballum 12399	100	100	80	100
Ballum 42600	90	100	100	90
Canicola	40	50	20	50
Ictero	10	30	10	20
Pomona	10	20	0	10
Coeficiente de correlación de Pearson	$\delta p=1$		$\delta p=0,988$	

#### **Leyenda**

$\delta p$ : Coeficiente de correlación de Pearson

Para ambas DL<sub>50</sub> existe una correlación lineal entre protección y seroconversión.

**Comparación de los niveles de concentración de anticuerpos IgG específicos al serogrupo Ballum inducidos en hámsteres inmunizados con vax-SPIRAL<sup>®</sup>, posterior a la primera y segunda dosis de vacuna trivalente y posterior al búster con vacuna monovalente de Ballum 12399 con relación a los niveles iniciales, según el método de**

Tiempo (semana)	Concentración de IgG (U/mL) por animal												p*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media	SD	
T <sub>0</sub>	2,467	2, 589	1,455	1,918	2,494	2,535	2,104	1,876	1,539	2,003	2,245	0,203	
T <sub>1</sub>	23,14	49,00	8,42	25,29	19,97	41,14	38,45	30,76	14,98	16,78	27,828	6,611	
T <sub>4</sub>	38,37	38,17	58,47	11,34	33,59	23,57	41,78	35,67	50,03	47,63	33,920	7,093	
T <sub>7</sub>	58,55	112,67	119,73	32,01	34,82	30,15	44,54	43,39	59,48	54,28	59,488	13,677	
T <sub>1</sub> /T <sub>0</sub>	9,379	18,926	5,786	13,185	8,007	16,228	18,274	16,396	9,733	8,377	12,429	4,758	0,009
T <sub>4</sub> /T <sub>0</sub>	15,553	14,743	40,185	5,912	13,468	9,297	19,857	19,013	32,508	23,779	19,431	10,430	0,001
T <sub>7</sub> /T <sub>1</sub>	2,530	2,299	14,219	1,265	1,743	0,732	1,158	1,410	3,970	3,234	3,256	3,980	0,022
T <sub>7</sub> /T <sub>4</sub>	1,525	2,951	2,047	2,822	1,036	1,279	1,066	1,216	1,188	1,139	1,627	0,727	0.012

Tiempo (semana)	Concentración de IgG (U/mL) por animal												p**
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media	SD	
T <sub>0</sub>	3,5	2,465	2,195	3,1	2,254	2,345	2,765	3,654	2,567	2,986	2,783	0,514	
T <sub>1</sub>	3,2	2,475	2,501	3,7	3,8	3,456	2,567	3,245	2,654	2,456	3,005	0,533	
T <sub>4</sub>	4,012	2,267	2,314	4,12	4,01	3,134	2,879	3,654	3,185	3,856	3,343	0,695	
T <sub>7</sub>	3,9	2,382	2,554	3,5	2,198	3,145	2,786	3,875	3,765	2,876	3,098	0,634	
T <sub>1</sub> /T <sub>0</sub>	0,914	1,004	1,139	1,193	1,685	1,473	0,928	0,888	1,033	0,8222	1,108	0,277	0,000
T <sub>4</sub> /T <sub>0</sub>	1,146	0,919	1,054	1,329	1,779	1,336	1,041	1	1,240	1,2918	1,213	0,247	0,000
T <sub>7</sub> /T <sub>1</sub>	1,218	0,962	1,021	0,945	0,578	0,910	1,085	1,194	1,418	1,171	1,050	0,227	0,114
T <sub>7</sub> /T <sub>4</sub>	0,972	1,050	1,103	0,849	0,548	1,003	0,967	1,060	1,182	0,745	0,948	0,188	0,017

### Leyenda

T<sub>0</sub>: antes de la aplicación de la primera dosis

T<sub>1</sub>: dos semanas después de aplicada la primera dosis

T<sub>4</sub>: una semanas después de aplicada la segunda dosis (semana 7)

T<sub>7</sub>: una semana después de aplicado el búster con Ballum (semana 13)

p\* probabilidad para la comparación de las concentraciones de IgG específica entre los tiempos dentro del estudio

p\*\* probabilidad para la comparación de las concentraciones de IgG específica entre los tiempos con relación a los controles.

## BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR RELACIONADA CON EL TEMA

1. González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, González I, Izquierdo L, Sierra G. Vacuna Antileptospirósica Trivalente Adsorbida para uso en humanos. Primer ensayo evaluativo de la reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. *VacciMonitor* 1997;5(6):2-8.
2. Naranjo M, González M, Herrera B, Rodríguez Y, Oliva R, Valdés Y. Resultados preliminares en la estandarización de un ELISA indirecto para la cuantificación de albúmina en lotes de antígenos de la vacuna antileptospirósica triple cubana. *VacciMonitor* 1998;6(8):7-11
3. Rodríguez Y, González M, Naranjo M, González I, Oliva R, Fariñas M. Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de componentes extracelulares de *Leptospira Interrogans* serovar canícola. *VacciMonitor* 1998;6(7):11-17.
4. Oliva R, Infante JF, González M, Pérez P, Naranjo M, Fariñas M, González I, Rodríguez Y. Estudio de protección con vax-SPIRAL<sup>®</sup> en grupos (madre-cría) de Hámster Sirio Dorado. *VacciMonitor* 1999;7(12):7-14.
5. Naranjo M, Rodríguez Y, Oliva R, Jáuregui U, González M. Esquema de inmunización en hámster frente al Preparado Vacunal Antileptospirósico Cubano. *Acta Farm. Bonaerense* 1999;18(2):121-126.
6. González M, Martínez R, Naranjo M, Batista N, Torres C, Padrón S, Domínguez F, Barberá R, Campa C. vax-SPIRAL<sup>®</sup>, Vacuna antileptospirósica trivalente para uso en humano, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. *Biotecnología Aplicada* 2004; 21(2):107-111.
7. González M, Martínez R, Naranjo M, Batista N, Torres C, Padrón S, Domínguez F, Barberá F, Campa C. vax-SPIRAL<sup>®</sup>, Trivalent Antileptospirósica Vaccine for human Use, Research, Development and Impact on the Disease in Cuba. *Medic Review* 2004;2(54):33-41.
8. González M, Batista N, Machado M, Savournin O, Saltarén A, Saname A, Ochoa I, Rodríguez Y, Naranjo M, Valdés Y, González I, Sierra G. Caracterización de cepas de *Leptospira* Ballum aisladas de casos clínicos. Inmunidad cruzada en hámsters vacunado con vax-SPIRAL<sup>®</sup>. *Biotecnología Aplicada* 2004;21:77-81.

9. Naranjo M, Machado M, González M, Medina R, Abreu E, Abreu J, Batista N, Torre V, González A, Oramas J. Caracterización preliminar de antígenos reconocidos por sueros de individuos vacunados con vax-SPIRAL<sup>®</sup> en preparaciones de membrana externa de *Leptospira pomona* serovar mozdok. *Biotecnología Aplicada* 2006;23:28-33.
10. Machado M, Naranjo M, González M, Batista N, González A, Abreu Y, Torres V, Pérez V, Infante JF. Inmunoprotección de componentes de membrana externa de *Leptospira pomona* serovar mozdok. *VacciMonitor* 2007; 16(2):7-15.
11. Naranjo M, Suárez M, Fernández C, González M, Batista N, González I, Valdés Y, Infante JF, Sierra G. Confirmación microbiológica de un brote de leptospirosis en Honduras tras el paso del huracán Mitch y potencialidad profiláctica de vax-SPIRAL<sup>®</sup>. *VacciMonitor* 2007;16(3):13-19.
12. Naranjo M, Batista N, Valdés Y, González M, Infante JF, Sierra G. vax-SPIRAL<sup>®</sup>, vacuna trivalente (*Canicola-Icterohaemorrhagiae-Pomona*). Capacidad protectogénica cruzada frente al reto con L. Ballum de alta patogenicidad en el modelo Hámster Sirio Dorado. *VacciMonitor* 2008;17(2):14-19.
13. Naranjo M, Suárez M, Fernández C, González M, Batista N, González I, Valdés Y, Infante JF, Sierra G. Study of a Leptospirosis Outbreak in Honduras Following Hurricane Mitch and Prophylactic Protection of the vax-SPIRAL<sup>®</sup> Vaccine. *Medic Review* 2008;10(3):38-42.
14. Batista N, Naranjo M, Blain K, Sierra G, Oliva R, Amador JJ, Jirón W, Duttman C, Vallecito R, Sólis RL. vax-SPIRAL<sup>®</sup>, vacuna trivalente (*Canicola-Icterohaemorrhagiae-Pomona*). Protección frente al reto experimental, con cepas aisladas de casos clínicos en Nicaragua, en el biomodelo Hámster Sirio. *Medic Review* 2009 (en prensa).
15. Batista N, Naranjo M, Oliva R, Blain K, Sólis RL, Sierra G. Evaluación la patogenia, crecimiento y perfil antigénico celular de cepas aisladas de los departamentos de León y Chinandega, Nicaragua (en revisión).

## **RESULTADOS RELEVANTES DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA RELACIONADOS CON ESTA TEMÁTICA.**

1. “Desarrollo de biomodelos eficaces en la evaluación de preparados vacunales contra Leptospira y Cólera”. 1997. R. Oliva, JF. Infante, M. González, L. García, P. Pérez, Y. Bebelagua, JL. Pérez, M. Fariñas, H. García, L. Estévez, B. Cedré, M. Naranjo, Y. Rodríguez, V. Pérez, E. Muñoz, G. Sierra, C. Campa.
2. “vax-SPIRAL®: Vacuna antileptospirósica trivalente para uso en humanos, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba”. 2003. González M, Martínez R, Naranjo M, Batista N, Torres C, Padrón S, Domínguez F, Barberá R, Campa C.

## **PREMIOS DEL FORUM NACIONAL RELACIONADOS CON ESTA TEMÁTICA.**

1. “Sistema de modelos experimentales para demostrar la eficacia de vacunas y sueros”. Mención IX Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 1994.
2. “Estudios básicos y preclínicos en el desarrollo de una vacuna trivalente antileptospirósica humana”. Ponencia Destacada XI Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 1996
3. “Desarrollo de biomodelos eficaces en la evaluación de preparados vacunales contra Leptospira y Cólera”. 1997. R. Oliva, JF. Infante, M. González, L. García, P. Pérez, Y. Bebelagua, JL. Pérez, M. Fariñas, H. García, L. Estévez, B. Cedré, M. Naranjo, Y. Rodríguez, V. Pérez, E. Muñoz, G. Sierra, C. Campa.

Premio Nacional de la 8va Exposición Nacional Forjadores del Futuro 1997

## TESIS TUTORADAS RELACIONADAS CON EL TEMA.

1. "Resultados preliminares en la caracterización de la respuesta humoral en personas vacunadas con la vacuna antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL®". Instituto Politécnico de Química Mártires de Girón. 1997.
2. "Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora de cepas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum serovares Ballum y Arborea, aisladas de casos clínicos en humanos". Instituto Politécnico de Química Mártires de Girón. 1998.
3. "Separación de la albúmina sérica bovina de sobrenadantes de *Leptospira interrogans* serovar Pomona". Instituto Politécnico de Química Mártires de Girón. 1998.
4. "Purificación y evaluación del lipopolisacárido de *Leptospira interrogans* serovar Mozdok. Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana. 1999
5. "Purificación y evaluación de proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* serovar Mozdok". Facultad de Biología de la Universidad de la Habana. 1999.