

# INMUNIZACION CONTRA LA LEPTOSPIROSIS: CONTINUACION DE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN CRICETOS CON VACUNAS OBTENIDAS DE CEPAS AISLADAS EN BARBADOS<sup>1</sup>

Dres. J. A. Zeigler, K. M. Kubica y R. H. Jones<sup>2</sup>

*Suspensiones calentadas de células enteras provenientes de cepas copenhageni del serotipo de Leptospira interrogans, aisladas en el campo, en Barbados, demostraron ser inmunógenos protectores contra la leptospirosis experimental.*

## Introducción

En un informe anterior (1) hemos descrito la preparación y eficacia de bacterinas de células enteras muertas por calor, derivadas de conocidas cepas modelo de laboratorio de los serotipos virulento y avirulento *canicola* Moulton y *pomona* HCE de *Leptospira interrogans*. En la presente investigación<sup>3</sup> se ha evaluado la eficacia de bacterinas de células enteras muertas por calor, de aislantes *copenhageni* del serotipo de *Leptospira interrogans* provenientes de Barbados, en cricetos inmunizados contra una confrontación homóloga. Los datos obtenidos de todos los estudios demuestran hasta ahora que la concentración de bacterinas muertas por calor, necesaria para proteger contra la leptospirosis experimental en cricetos, es de 1 µg y 10 µg, si se emplea respectivamente una cepa virulenta o avirulenta como una fuente de bacterinas.

## Material y métodos

Los organismos utilizados en el presente estudio fueron amablemente cedidos por la Sra. C. June Roach, del Laboratorio de Diag-

nóstico Veterinario, St. Michael, Barbados. La identificación del serotipo fue realizada por la Sra. K. Sulzer, del Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, Georgia. Los aislantes *copenhageni* 354, 355, 375, 706 y 716 del serotipo de *Leptospira interrogans* se obtuvieron por extracción de riñones de rata (*Rattus rattus*). Los serotipos *autumnalis* 621 y 693 se aislaron, respectivamente, de los riñones de una mangosta (*Herpestis auro-punctatus*) y de una rata (*Rattus rattus*).

Todos los serotipos se conservaron en un medio semisólido de polisorbato 80 a base de albúmina bovina (BAP-80) (2) y se procedió al subcultivo a intervalos de 30 días. Los cultivos líquidos de BAP-80 se prepararon mediante la inoculación de un medio semisólido fresco, y luego de cinco a siete días de desarrollo se transferían a un volumen adecuado de medio líquido BAP-80. La temperatura de incubación fue de 30°C.

La bacteria muerta por calor se preparó de la manera descrita en nuestra publicación anterior (1). Para realizar las pruebas de la vacuna, se distribuyeron hembras de criceto en destete, con un peso de 40 g, en cinco grupos de cinco animales. A cada grupo se le inyectaron por vía intraperitoneal 100, 10, 1.0 ó 0.1 µg/ml de bacteria de células enteras muertas por calor. El grupo de control recibió una solución salina la 0.85%.

A los 14 días de la inoculación, los cricetos inmunizados y de control fueron confron-

<sup>1</sup> Se publica también en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol. XII, No. 2, 1978.

<sup>2</sup> Todos los autores pertenecen al Instituto de Investigaciones Médicas, Instituto de Tecnología de Florida, Melbourne, Florida, E.U.A.

<sup>3</sup> Esta investigación contó con el apoyo del Proyecto AMRO-3139 de la Organización Panamericana de la Salud, y de la subvención No. 74346 de la Fundación John A. Hartford, de Nueva York, Nueva York.

tados, también por vía intraperitoneal, con  $1 \times 10^6$  células/animal del serotipo homólogo. Los animales se mantuvieron en observación durante 21 días. Luego se preparó un cultivo del tejido de los riñones y del hígado de los animales que habían muerto durante el período de observación. Se sacrificaron los cricetos sobrevivientes y se prepararon cultivos de los mismos órganos. Diluciones seriadas de los tejidos homogeneizados, preparadas en una base de PAB-80, se inocularon en un medio semisólido completo de BAP-80. Estos cultivos se incubaron a 30°C y se examinaron semanalmente durante 10 semanas. La presencia de células de leptospiras, observadas en la microscopia de campo oscuro, indicaba que el cultivo era positivo. A los medios aislantes no se les añadió ni sulfato de neomicina ni ciclohexamida.

Todos los recuentos celulares se efectuaron por microscopia de campo oscuro, utilizando una cámara de recuento de Petroff-Hausser.

### Resultados y análisis

Los resultados de este estudio en que se utilizaron leptospiras aisladas del campo en Barbados, están de acuerdo con nuestros trabajos anteriores (1), en los que se emplearon cepas modelo de *Leptospira* obtenidas en laboratorio.

En un intento por normalizar el sistema de prueba de los animales para el serotipo *copenhageni*, se eligió como cepa de confrontación el aislante 375, y se valoró en cricetos

para establecer la  $DL_{50}$ . Los resultados se presentan en el cuadro 1. Se comprobó que la  $DL_{50}$  era menor a 10 células/ml, y no se hizo ningún intento para determinar el número exacto. Con excepción del aislante 354, todos los aislantes del serotipo *copenhageni* dieron titulaciones análogas. Se comprobó que el aislante 354 no era letal para los cricetos, pero originaba persistentemente la condición de "vector" al ser inyectado a los animales de prueba. Los experimentos que se están realizando permitirán determinar la eficacia de la bacterina de células enteras muertas por calor, contra la creación del estado de vector debido a esta cepa.

Los resultados de las pruebas de inmunización empleando aislante 375 serotipo *copenhageni*, proveniente del campo en Barbados, figuran en el cuadro 2 y están de acuerdo con los presentados en nuestro informe anterior (1), al emplear serotipos modelo de laboratorio *canicola* Hond Utrecht IV y *pomona* S91. Sin embargo, los resultados no coinciden con los datos previamente descritos para los serotipos *canicola* Moulton y *pomona* HCE. La bacterina de células enteras muertas por calor preparada con el serotipo *copenhageni* protegió contra la muerte y las infecciones renales a una dosis de 10 µg. Con una dosificación de 1.0 µg, solo un 87.5% de los cricetos vacunados estaba protegido contra estas dos agresiones. Las bacterinas preparadas con *canicola* Moulton y *pomona* HCE protegieron al 100% de los animales con una dosis de 1.0

CUADRO 1—Resumen de los datos sobre evaluación de la virulencia del aislante 375 serotipo *copenhageni*.

| Organismos/<br>ml <sup>a</sup> | No. de muertos/<br>No. de animales<br>usados | No. positivo/<br>No. cultivos<br>renales | No. positivo/<br>No. cultivos<br>hepáticos | Momento en que<br>murió (en días) |
|--------------------------------|--|--|--|-----------------------------------|
| $1 \times 10^6$                | 10/10  | 10/10                                    | 10/10                                      | 7.0                               |
| $1 \times 10^5$                | 10/10  | 10/10                                    | 10/10                                      | 8.0                               |
| $1 \times 10^4$                | 10/10  | 10/10                                    | 10/10                                      | 12.0                              |
| $1 \times 10^3$                | 10/10  | 10/10                                    | 10/10                                      | 12.5                              |
| $1 \times 10^2$                | 10/10  | 10/10                                    | 10/10                                      | 13.5                              |
| $1 \times 10^1$                | 10/10  | 10/10                                    | 10/10                                      | 13.5                              |

<sup>a</sup> Inoculados por vía intraperitoneal en cricetos en destete que pesaban 40 g.

CUADRO 2—Resumen de los ensayos de inmunización con bacterina<sup>a</sup> de células enteras muertas por calor del serotipo *copenhageni*.<sup>b</sup>

| Dosis<br>( $\mu\text{g}$ /animal) | No. de muertos/<br>No. de animales<br>usados | No. positivo <sup>c</sup> /<br>No. cultivos<br>renales | No. positivo <sup>c</sup> /<br>No. cultivos<br>hepáticos | % de<br>cultivos<br>positivos |
|-----------------------------------|--|--|--|-------------------------------|
| 100.0                             | 0/20   | 0/20   | 0/20   | 0.0                           |
| 10.0                              | 0/20   | 0/20   | 0/20   | 0.0                           |
| 1.0                               | 5/20   | 5/20   | 5/20   | 12.5                          |
| 0.1                               | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 100.0                         |
| Grupo de control                  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 100.0                         |

<sup>a</sup> Catorce días después de la inmunización los animales de prueba y los controles fueron confrontados por vía intraperitoneal con  $1 \times 10^6$  células/ml de aislante 375 serotipo *copenhageni*.

<sup>b</sup> El promedio del tiempo de la muerte del animal por inoculación de  $1 \times 10^6$  células/ml de aislante 375 serotipo *copenhageni*, es de 7 días.

<sup>c</sup> A los 21 días de la inoculación los animales sobrevivientes fueron sacrificados y se prepararon cultivos de sus riñones e hígados.

$\mu\text{g}$ . Una posible explicación de la diferencia de resultados con la bacterina preparada a base del aislante 375, serotipo *copenhageni*, proveniente del campo en Barbados, puede ser debido a que hay reducción de virulencia con la consiguiente pérdida de la misma. Se comprobó que había pérdida de virulencia cuando se inoculaba a cricetos con cultivos disponibles "en existencia". De 10 cultivos en existencia ensayados, se verificó que siete eran avirulentos. En consecuencia, es posible que el cultivo concreto con que se preparó la bacterina no fuese virulento.

No obstante, estos datos apoyan nuestra tesis en el sentido de que las bacterinas de células enteras muertas por calor y preparadas de aislantes obtenidos en el campo, protegen contra la infección debido a un serotipo homólogo. La confrontación representada por la vacunación con aislantes 354 y 355 dio resultados compatibles con los del aislante 375, es decir, era necesaria una dosis de  $10 \mu\text{g}$  para proteger contra la muerte y/o las infecciones renales. Este hecho es compatible con el hallazgo anterior de que  $10 \mu\text{g}$  de bacterinas muertas por calor obtenidas de cepas no virulentas, protegen contra la agresión de serotipos homólogos virulentos.

En el campo de Barbados se continúan los

trabajos con otro aislante, a saber: el aislante *autumnalis* 621 del serotipo de *Leptospira*. En el cuadro 3 aparece la evaluación de la virulencia de esta cepa, que ha demostrado ser muy letal. En la actualidad se efectúan pruebas de vacunación con esta cepa.

CUADRO 3—Evaluación preliminar de la virulencia para el aislante 621 serotipo *autumnalis*.

| No. de<br>células/ml <sup>a</sup> | No. de muertos/No.<br>de animales<br>inoculados | Momento en que<br>murió (en días) |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| $2 \times 10^6$                   | 4/4   | 3.5                               |
| $1 \times 10^4$                   | 2/2   | 7.0                               |
| $1 \times 10^3$                   | 4/4   | 7.5                               |
| $1 \times 10^2$                   | 4/4   | 8.0                               |
| $1 \times 10^1$                   | 4/4   | 8.5                               |
| $1 \times 10^0$                   | 4/4   | 9.0                               |

<sup>a</sup> Inoculadas por vía intraperitoneal en cricetos en destete que pesaban 40 g.

## Resumen

Suspensiones de tres aislantes de células enteras calentadas de *copenhageni* del serotipo *L. interrogans*, obtenidas en el campo, demostraron ser inmunógenos eficaces para proteger a cricetos contra la leptospirosis experimental. Estos datos han confirmado nuestros trabajos anteriores, en los que sus-

pensiones de células enteras calentadas resultaron ser inmunógenos protectores. La facilidad y economía con que se pueden pre-

parar tales inmunógenos representan ventajas para utilizar estos procedimientos en el campo. □

#### REFERENCIAS

(1) Zeigler, J. A., R. H. Jones y K. Kubica. Inmunización contra la leptospirosis: Ensayo de vacuna en cricetos con antígenos de células enteras muertas por calor y de envoltura externa. *Bol Of Sanit Panam* 81(4):326-330, 1976.

(2) Ellinghausen, H. C., Jr. y W. G. McCullough. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: A serum-free medium employing oleic-albumin complex. *Am J Vet Res* 26:39-44, 1965.

#### Immunization against Leptospirosis: Continued vaccine trials in hamsters using strains isolated from Barbados (Summary)

Heated whole cell suspensions of three field isolants of *L. interrogans* serotype *copenhageni* revealed to be effective immunogens in protecting hamsters against experimental leptospirosis. These data confirm our previous work where heated

whole cell suspensions were shown to be protective immunogens. The ease and economics of preparing such immunogens are advantages offered for use of such procedures in this field.

#### Imunização contra a leptospirose: Continuação dos experimentos feitos em cricetídeos com vacinas obtidas de estirpes isoladas em Barbados (Resumo)

As suspensões de tres isolantes de células inteiras aquecidas de *copenhageni* do serotipo de *L. interrogans*, obtidas no campo, demonstraram ser imunizadores eficazes para proteger os cricetídeos contra a leptospirose experimental. Estes dados confirmaram nossos trabalhos anteriores

nos quais as suspensões de células inteiras aquecidas, resultaram ser imunizadores protectores. A facilidade e economia com que se podem preparar esses imunizadores são uma vantagem para empregar esses métodos no campo.

#### Immunisation contre la leptospirose: Poursuite des tests réalisés sur des hamsters avec des vaccins obtenus à partir de souches isolées à La Barbade (Résumé)

Des suspensions chauffées de cellules entières de trois isolants *copenhageni* du sérotype *L. interrogans* obtenus sur le terrain ont démontré être des immunogènes efficaces pour la protection des hamsters contre la leptospirose expérimentale. Nous avons là une confirmation de nos travaux

antérieurs au cours desquels nous avons constaté que les suspensions chauffées de cellules entières constituaient des immunogènes protecteurs. La préparation de ces immunogènes étant aisée et économique, ces procédés peuvent être avantageusement utilisés sur le terrain.