

Inmunogenicidad y capacidad protectora en hamsters de vacunas antileptospirósicas monovalentes de células enteras del serogrupo Ballum

A. GONZÁLEZ*, Y. RODRÍGUEZ, N. BATISTA, Y. VALDÉS, J.F. NÚÑEZ, M. MIRABAL, M. GONZÁLEZ

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas
Ave. 27 N° 19805, La Lisa. AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.

*Correspondencia. E-mail: andresglez@finlay.edu.cu

RESUMEN

El serogrupo Ballum de *Leptospira* constituye en la actualidad la primera causa de leptospirosis humana en Cuba. Vacunas de células enteras químicamente inactivadas fueron formuladas a partir de dos cepas clínicas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum empleando como adyuvante hidróxido de aluminio. Los niveles de aglutininas inducidos en hamsters por una u otra preparación vacunal fueron estimados mediante aglutinación microscópica y la actividad IgG específica fue cuantificada mediante ELISA. La capacidad de protección homóloga y heteróloga contra la infección letal y subletal se determinó mediante el desafío con 100 y 10 000 DL₅₀ de cinco cepas virulentas pertenecientes a los serogrupos Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Las evaluaciones realizadas demostraron que ambas vacunas fueron inmunogénicas e indujeron una completa protección homóloga en el modelo animal empleado. La protección cruzada frente a serogrupos heterólogos solo fue significativa en una de las preparaciones monovalentes frente al desafío con 100 DL₅₀ de Canicola. Como resultado de este estudio se pudo comprobar la alta inmunogenicidad y capacidad protectora en hamsters de vacunas monovalentes de células enteras formuladas a partir de dos cepas candidatas vacunales del serogrupo de *Leptospira* de mayor circulación en humanos en Cuba no incluido en la vacuna actualmente disponible.

Palabras clave: *Leptospira*, vacunas, inmunogenicidad, protección

SUMMARY

Immunogenicity and protective capacity of leptospiral whole-cell monovalent serogroup Ballum vaccines in hamsters. *Leptospira* serogroup Ballum is at present the first cause of human leptospirosis in Cuba. Killed whole-cell vaccines were formulated with two clinical isolates of *Leptospira interrogans* serogroup Ballum using aluminum hydroxide as adjuvant. Agglutinins levels induced by each vaccine in hamsters were estimated by microscopic agglutination test and specific IgG activities were quantified by a whole cell-based enzyme-linked immunosorbent assay. Homologous and cross protective capacity against lethal and sublethal infection were determined in vaccinated animals by challenge with 100 and 10 000 LD₅₀ of five virulent strains belonging to serogroups Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae and Pomona. Both monovalent serogroup Ballum vaccines were immunogenic and induced complete homologous protection in the animal model. Cross-protection was only significant in one of the two vaccines against challenge with 100 LD₅₀ of serogroup Canicola. The results of this study demonstrate the high immunogenicity and protective capacity in hamsters of whole-cell monovalent vaccines formulated with two vaccine candidate strains belonging to the most prevalent serogroup of *Leptospira* in Cuba.

Key words: *Leptospira*, vaccines, immunogenicity, protection

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de amplia distribución mundial causada por espiroquetas patógenas pertenecientes al género *Leptospira* (8, 18). Esta infección ha dejado de ser considerada un riesgo ocupacional característico de zonas rurales para convertirse en una enfermedad emergente con grandes brotes en zonas urbanas de países tropicales como Nicaragua (28), Brasil (16) o la India (29). A pesar del enorme interés de la comunidad científica en desarrollar nuevas es-

trategias de vacunas que garanticen un amplio espectro de protección frente a casi 230 serovariedades patógenas al hombre y los animales, las vacunas de células enteras inactivadas continúan siendo en la actualidad la medida inmunoproláctica más eficaz, con una protección serotipo específica y de relativa corta duración (8).

La aplicación en Cuba a grupos humanos de riesgo de la vacuna trivalente vax-SPIRAL® (19, 20), diseñada para establecer protección contra los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, ha logrado controlar y disminuir la morbilidad y letalidad de la

leptospirosis humana con una elevada efectividad. Sin embargo, en los últimos años la situación inmunoepidemiológica ha variado, y en la actualidad el serogrupo Ballum es el más frecuentemente aislado en todo el país (24), siendo necesarias nuevas formulaciones vacunales que contengan a este serogrupo para lograr un apropiado control inmunoproláctico.

Previo a la inclusión del serogrupo Ballum en una formulación vacunal para uso humano resulta imprescindible una adecuada selección y caracterización de las cepas candidatas vacunales (11), así como investigaciones básicas en modelos animales que comprueben la capacidad inmunoprotectora de formulaciones obtenidas a partir de estas cepas, entre otros ensayos preclínicos y clínicos. El presente estudio tuvo como objetivos evaluar la inmunogenicidad en hamsters de vacunas monovalentes obtenidas a partir de dos cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum, así como su capacidad de protección homóloga y heteróloga frente a la infección experimental por cepas pertenecientes a cuatro serogrupos de *Leptospira* de mayor circulación en humanos en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

En el estudio se utilizaron las cepas candidatas vacunales 12399 y 42600 de *Leptospira interrogans* s.l. serogrupo Ballum (11), las cuales fueron originalmente aisladas por hemocultivo a pacientes con leptospirosis en la provincia de Holguín. Se utilizaron además las cepas vacunales 87, 169 y 108, pertenecientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente, las cuales fueron originalmente aisladas a partir de material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana. Todas las cepas fueron mantenidas rutinariamente mediante subcultivos semanales en medio EMJH (7, 15) bajo condiciones estáticas y conservadas en medio semisólido de Fletcher (8). La virulencia fue mantenida a través de pases periódicos en hamsters según los métodos descritos (8). La dosis letal media (DL_{50}) fue determinada mediante la metodología propuesta por Fajardo y colaboradores (10).

Formulación de las vacunas monovalentes

Se formularon preparaciones vacunales monovalentes de células enteras inactivadas adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio a partir de cada cepa candidata vacunal del serogrupo Ballum, siguiendo la metodología utilizada para la vacuna trivalente vax-SPIRAL® (14) con ligeras modificaciones. Las cepas altamente virulentas fueron crecidas en medio EMJH hasta finales de la fase exponencial de crecimiento. Los cultivos fueron inactivados químicamente mediante la exposición a formalina 0,5% durante 20 minutos. Las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas al menos tres veces con tampón fosfato salino estéril pH 7,2 (TFS: ClNa 137 mM, ClK 2,7 mM, PO_4Na_2H 10 mM) para ser finalmente resuspendidas en el mismo tampón hasta una concentración de 6×10^8 células/ml. Las células inactivadas y lavadas fueron adsorbidas aseptícamente en gel de hidróxido de aluminio estéril mediante agitación lenta durante toda la noche, adicionando finalmente tiomersal como conservante. La composición final por dosis de 0,5 ml para cada vacuna monovalente fue la siguiente:

Células enteras inactivadas	1,5-2,4 $\times 10^8$
Gel de hidróxido de aluminio	1,00 mg
Tiomersal	0,05 mg

Antes y durante el proceso de formulación vacunal, fueron realizados controles de pureza, identidad y virulencia a las cepas, inactivación e identidad a los antígenos, así como esterilidad y adsorción a los preparados vacunales según los procedimientos descritos (14). Los preparados vacunales con resultados satisfactorios en todos los controles realizados fueron envasados aseptícamente en volúmenes de 5,2 ml empleando bulbos de cristal de 10 ml con tapa de goma y retapa metálica y luego conservados a 4 °C hasta su uso.

Evaluación de la inmunogenicidad en hamsters

La inmunogenicidad de cada vacuna monovalente de Ballum se evaluó en hamsters siguiendo la vía, dosis y esquema de inmunización recomendados para la vacuna trivalente vax-SPIRAL® (23). Grupos de 10 animales de 45-50 gramos de peso fueron inmunizados con una u otra preparación vacunal monovalente por vía intramuscular, empleando dos dosis de 0,5 ml separadas por un intervalo de 6 semanas. Fueron tomadas muestras de sangre semanales por vía retroorbital a cada animal previo a la primera dosis vacunal y hasta los 21 días después de la segunda dosis. Simultáneamente se realizaron extracciones de sangre semanales a 10 animales controles no inmunizados del mismo lote. Los sueros fueron colectados por centrifugación a 5 000 rpm durante 10 minutos, convenientemente rotulados y conservados a -20 °C hasta su evaluación.

Los niveles de aglutininas específicas inducidos por cada vacuna monovalente frente al antígeno homólogo, tras 14 días de aplicada la segunda dosis, se estimaron mediante la técnica de aglutinación microscópica (MAT) (6).

Los niveles de IgG específica inducidos por cada preparación vacunal frente al antígeno homólogo y a otros cuatro antígenos no incluidos en la formulación se cuantificaron mediante un sistema ELISA cuantitativo estandarizado. Se utilizó para el recubrimiento en cada caso las células completas inactivadas y lavadas de las cepas 42600, 12399, 87, 169 y 108. Las placas (COSTAR®, Corning, Estados Unidos) fueron sensibilizadas con 100 ml de antígeno ajustado a 2×10^8 células/ml y desecadas toda la noche 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% (p/v) en TFS. Las muestras de suero a evaluar se diluyeron 1:200 en TFS con 3% de leche descremada y 0,05% de Tween 20. Se utilizó como conjugado proteína A-peroxidasa (Sigma, Estados Unidos) diluido 1:15 000 en el mismo medio de las muestras. El revelado se realizó adicionando la mezcla sustrato-cromógeno peróxido de hidrógeno 0,03%-OPD 1 mg/ml y buffer fosfato citrato pH 5. La reacción se detuvo a los 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, y las absorbancias se midieron utilizando un lector de ELISA (Titertek-Multiskan®, Joint Venture, Finlandia) a una longitud de onda de 492 nm. 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 hamsters con elevados títulos de aglutininas frente a los cinco antígenos según MAT. Se consideró como criterio de seroconversión en todos los casos el incremento de al menos cuatro veces los niveles de IgG específica tras completado el esquema de inmunización, en comparación con los mismos previo a la primera dosis vacunal.

Evaluación de la capacidad de protección homóloga y heteróloga

Se evaluó la protección homóloga y heteróloga conferida por cada vacuna monovalente frente al desafío con 100 y 10 000

DL₅₀ de cada una de las cepas candidatas vacunales de Ballum incluidas en la formulación, y de las cepas vacunales 87, 169 y 108 pertenecientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente. Grupos de 110 animales de 45-50 gramos de peso fueron inmunizados con una u otra vacuna monovalente por vía intramuscular, empleando dos dosis de 0,5 ml separadas por un intervalo de 6 semanas. Tras 14 días de completado el esquema de inmunización, los animales fueron desafiados por vía intraperitoneal con una u otra dosis de cada cepa, empleando 10 animales por variante de desafío y 0,5 ml como volumen de inóculo. Un grupo de 10 animales inmunizados con cada preparación monovalente no fue desafiado y se tomó como control de inocuidad de las vacunas.

Todos los animales inoculados fueron observados durante un periodo de 14 días posteriores al desafío, tras lo cual los sobrevivientes de cada grupo fueron sacrificados y se realizó examen anatómico-patológico macroscópico y cultivo de hígado y riñón individualmente en medio proteico EMJH, con el objetivo de determinar la prevalencia del microorganismo en los principales órganos diana de la infección leptospirósica (8). Los cultivos de órganos fueron observados periódicamente bajo el microscopio de campo oscuro y se consideró como resultado negativo la ausencia de crecimiento tras 60 días de incubación a 30 °C.

Análisis estadístico

Los resultados de las evaluaciones serológicas realizadas así como los niveles de sobrevivencia obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el Test Exacto de Fisher de dos colas, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$ (21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La gran diversidad antigénica observada en *Leptospira* tiene como base pequeñas variaciones en la estructura y composición del lipopolisacárido (5). La inmunodominancia de este antígeno determina que las vacunas de células enteras actualmente disponibles induzcan mayormente una inmunidad humoral dirigida a epítopes polisacáridicos serogrupo/serovar específicos (8, 18), con limitada protección cruzada frente a serovares no incluidos en la formulación vacunal. En este estudio fueron formuladas dos vacunas monovalentes de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum con una composición similar a la vacuna antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL® actualmente aplicada en humanos en Cuba, pero incorporando como principio activo una concentración de células enteras inactivadas tres veces superior a la que presenta la vacuna trivalente para cada una de sus serovariedades (14). Al estimar mediante MAT el nivel de aglutininas específicas inducido en hamsters por cada preparación vacunal monovalente frente a sus respectivos antígenos homólogos, se apreció que el 100% de los animales inmunizados alcanzó un título ≥ 1 : 256 tras 14 días de completado el esquema de inmunización con cualquiera de las dos variantes de vacuna aplicadas, mientras los títulos previos a la primera dosis vacunal fueron < 1 : 4, al igual que en los animales controles no inmunizados. Estos elevados títulos de aglutininas inducidos por una u otra vacuna monovalente no solo demuestran una alta inmunogenicidad sino además superan los títulos medios homólogos inducidos en hamsters

por otras vacunas antileptospirósicas adyuvadas como vax-SPIRAL® (14), 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® para cada una de las serovariedades que la componen. Otras vacunas no adyuvadas, aunque protectoras, han sido poco inmunogénicas según MAT tanto en animales como en humanos (25, 27). Varias investigaciones han demostrado que muy bajos niveles de aglutininas séricas logran ser protectores (8, 12).

La evaluación mediante ELISA de la respuesta IgG específica inducida por ambas preparaciones monovalentes frente al antígeno homólogo y a cuatro antígenos heterólogos reveló una alta seroconversión ($T_r/T_0 \geq 4$) 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, aunque la magnitud de la respuesta homóloga inducida por la preparación de antígeno 12399 (Figura 1) fue muy superior a la lograda tras la inmunización con antígeno 42600 (Figura 2). Los niveles de seroconversión logrados por ambas preparaciones frente a serogrupos heterólogos fueron considerablemente menores, ligeramente superiores a Canicola en comparación con Icterohaemorrhagiae y Pomona. Los resultados obtenidos demuestran que aun cuando los anticuerpos dirigidos a epítopes serogrupo/serovar específicos son mayormente de tipo IgM (13), la fracción de anticuerpos IgG dirigida a estos determinantes antigénicos también es considerable, y al parecer mucho mayor que aquella dirigida a epítopes conservados entre serogrupos diferentes. Los resultados sugieren 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 candidata vacunal 12399 pudiera ser la causa de su mayor inmunogenicidad en hamsters, en comparación con la cepa 42600, bajo los mismos criterios de formulación.

Los resultados de las evaluaciones serológicas realizadas estuvieron en correspondencia con la protección observada en el modelo animal, lo cual corrobora la importancia de la respuesta inmune humoral en la protección contra la infección leptospirósica (1, 8, 9). Al evaluar la capacidad de protección homóloga y heteróloga de cada vacuna monovalente frente al desafío con 100 y 10 000 DL₅₀ de cada cepa candidata vacunal del serogrupo Ballum y de las cepas vacunales pertenecientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, se apreció que ambas preparaciones confirieron significativos niveles de protección contra la infección letal frente a cualquiera de las dos cepas pertenecientes al serogrupo homólogo, mientras la protección

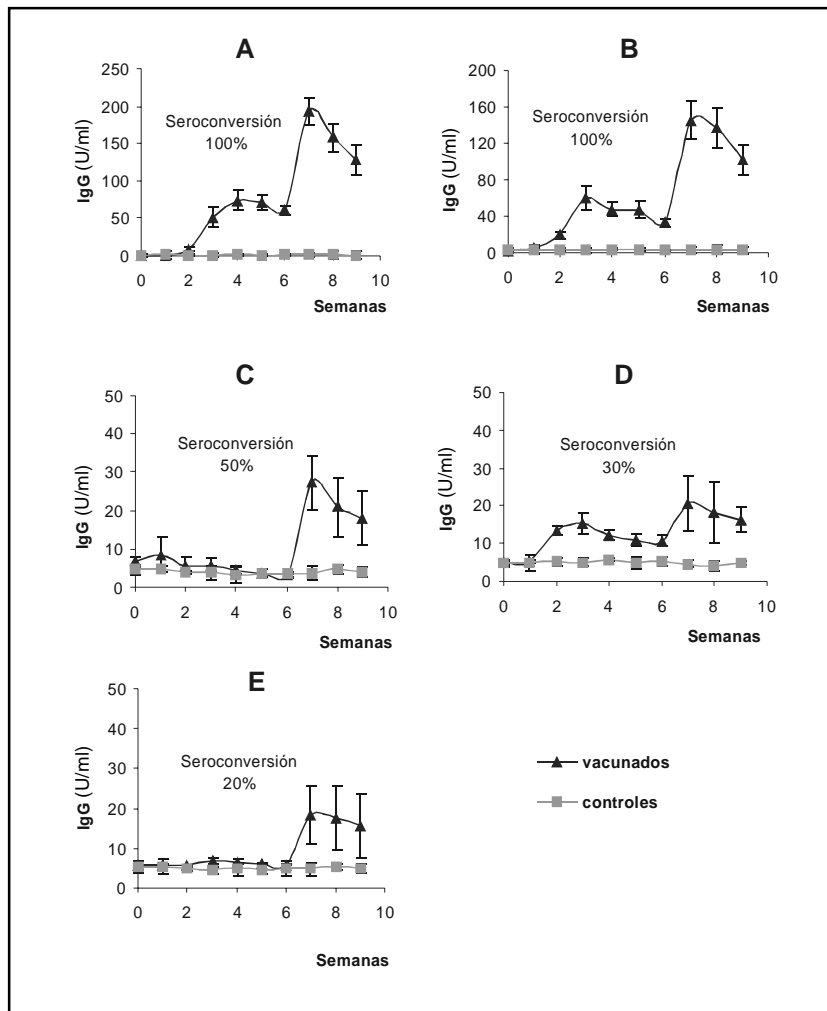


Figura 1. Respuesta IgG específica inducida en hámsters tras dos dosis de vacuna monovalente de Ballum (antígeno 12399). Los niveles de anticuerpos fueron determinados mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras utilizando para el recubrimiento las cepas 12399 (A) y 42600 (B) de Ballum, 87 de Canicola (C), 169 de Icterohaemorrhagiae (D) y 108 de Pomona (E). Los datos corresponden a las medias \pm desviaciones estándar de 10 animales evaluados. La seroconversión expresada en cada caso como el porcentaje de animales con relación $T_r/T_0 \geq 4$ del total vacunado.

cruzada frente a serogrupos heterólogos fue parcial y en algunos casos nula. Solo se apreció una protección cruzada estadísticamente significativa con la vacuna de antígeno 12399 frente al desafío con 100 DL_{50} del serogrupo Canicola (Figura 3).

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 es de limitada duración y restringida a la serovariedad componente o aquellas antigénicamente relacionadas (8). 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 (in-

fección de órganos y leptospiruria). 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 (17). Por tal motivo, el establecimiento de una eficaz protección no solo contra la infección letal sino además contra el estado de portador debe caracterizar a una buena vacuna profiláctica contra la leptospirosis. El análisis macroscópico de órganos en los animales inmunizados sobrevivientes al desafío en nuestro estudio reveló en todos los casos la ausencia de signos característicos de la infección como endurecimiento, hemorragias o ictericia. El cultivo de varias secciones de órganos en medio EMJH arrojó en todos los casos la ausencia de creci-

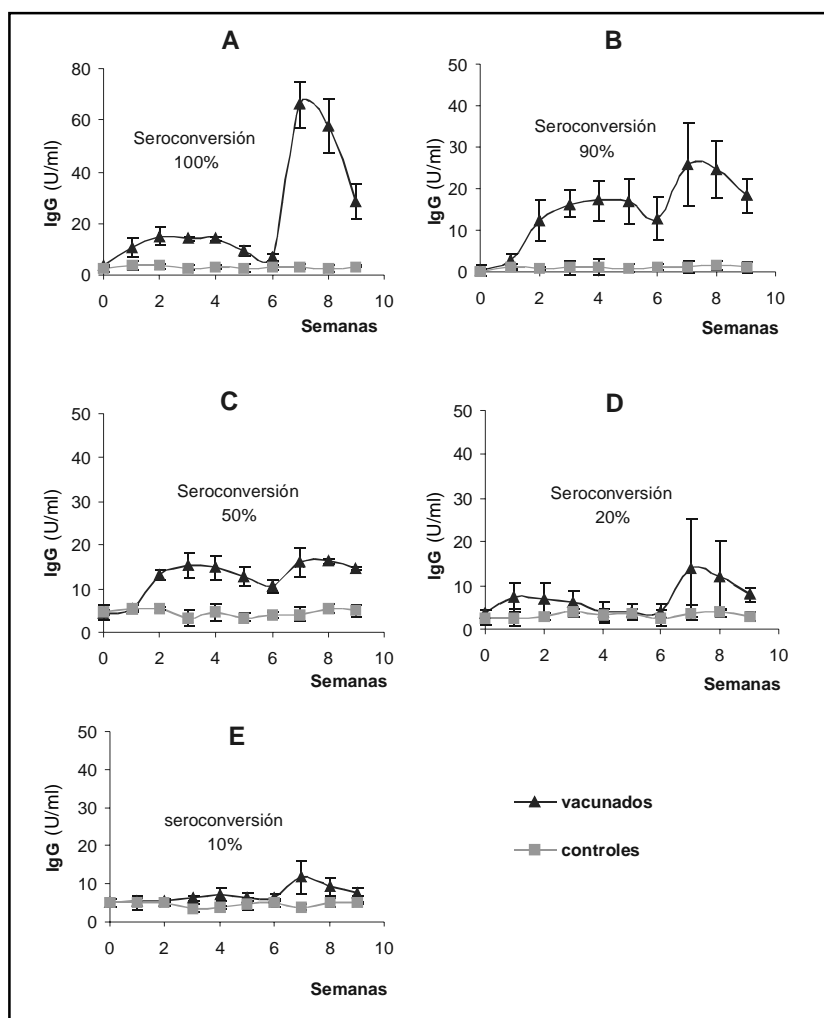


Figura 2. Respuesta IgG específica inducida en hámsters tras dos dosis de vacuna monovalente de Ballum (antígeno 42600). Los niveles de anticuerpos fueron determinados mediante un sistema ELISA cuantitativo de células enteras utilizando para el recubrimiento las cepas 42600 (A) y 12399 (B) de Ballum, 87 de Canicola (C), 169 de Icterohaemorrhagiae (D) y 108 de Pomona (E). Los datos corresponden a las medias \pm desviaciones estándar de 10 animales evaluados. La seroconversión expresada en cada caso como el porcentaje de animales con relación $T_7/T_0 \geq 4$ del total vacunado.

miento microbiano tras 60 días de incubación. Resultados similares fueron obtenidos, tanto con los sobrevivientes al desafío homólogo como al heterólogo, para cualquiera de las dos vacunas monovalentes de Ballum evaluadas. De esta forma, ambas preparaciones vacunales lograron prevenir el establecimiento del estado de portador en todos los casos en que se registró protección contra la infección letal. Esta total protección contra el estado de portador conferida por nuestras preparaciones monovalentes está en correspondencia con lo obtenido para otras vacunas antileptosirósicas adyuvadas (2) y en ello parece jugar un papel fundamental la respuesta inmune celular potenciada por el hidróxido de aluminio (4, 22).

Muy pocos han sido los estudios encaminados a demostrar la existencia de protección cruzada entre serogrupos diferentes de *Leptospira*. Algunos trabajos recientes indican la inducción de protección cruzada estadísticamente significativa por la fracción proteica de cepas de serogrupos diferentes (3, 26). Los resultados obtenidos en nuestro estudio evidenciaron una significativa protección de una de las vacunas monovalentes de Ballum frente al desafío con 100 DL₅₀ de Canicola. La magnitud de esta dosis de desafío heterólogo está en correspondencia con la utilizada por Branger y colaboradores (3), por lo que pudiéramos concluir que existe cierta protección cruzada entre los serogrupos Ballum y Canicola. La importancia de este resultado es aún más

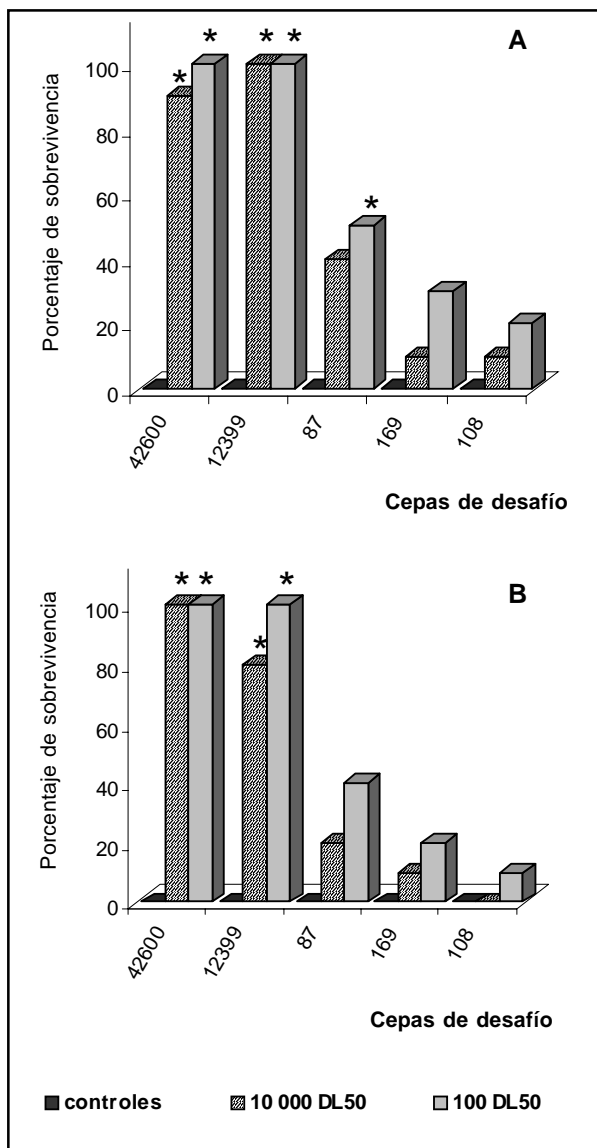


Figura 3. Protección contra la infección letal conferida en hamsters por las vacunas monovalentes de Ballum. (A) Vacuna monovalente de antígeno 12399. (B) Vacuna monovalente de antígeno 42600. Las barras representan los porcentajes de sobrevivencia tras el desafío con 100 y 10 000 DL₅₀ de las cepas 42600 (Ballum), 12399 (Ballum), 87 (Canicola), 169 (Icterohaemorrhagiae) y 108 (Pomona) a los 14 días de aplicada la segunda dosis vacunal. Los asteriscos denotan diferencias significativas en la protección (P < 0,05) respecto a los controles no inmunizados.

evidente si tenemos en cuenta que resulta poco probable una infección natural en animales o humanos con dosis tan elevadas como las utilizadas en este ensayo. La protección cruzada conferida frente al desafío con los serogrupos Icterohaemorrhagiae o Pomona fue menos relevante.

Como resultado de este estudio se pudo comprobar la alta inmunogenicidad y capacidad protectora en hamsters

de vacunas monovalentes de células enteras formuladas a partir de dos cepas candidatas vacunales del serogrupo de *Leptospira* de mayor circulación en humanos en Cuba, no incluido en la vacuna actualmente disponible. Se apreció además una protección cruzada estadísticamente significativa conferida por una preparación monovalente del serogrupo Ballum frente al desafío con 100 DL₅₀ de una cepa altamente virulenta del serogrupo Canicola. Estudios adicionales deberán ser encaminados a la evaluación de nuevas formulaciones vacunales antileptospirósicas mono o polivalentes, así como a la valoración de los mecanismos de respuesta celular que participan en la inmunidad conferida por estas vacunas.

Agradecimientos: Los autores desean agradecer al Dr. Rudy Hartskeerl del Royal Tropical Institute (KIT), Holanda por la clasificación serológica de las cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler B, Faine S, Muller H, Green D (1980) Maturation of humoral immune response determines the susceptibility of guinea-pigs to leptospirosis. *Pathology*. 12: 529-538.
- Bolin C, Alt D (2001) Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am. J. Vet. Res.* 62: 995-1000.
- Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, *et al.* (2001) Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect. Immun.* 69: 6831-6838.
- Brown R, Blumerman S, Gay C, Bolin C, Duby R, Baldwin C (2003) Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vaccine* 21: 4448-4458.
- Bulach D, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B (2000) Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Infect. Immun.* 68: 3793-3798.
- Cole J, Sulzer C, Pursell A (1973) Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Microbiol.* 5: 65-69.
- Ellinghausen H, McCullough W (1965) Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. *Am. J. Vet. Res.* 28: 39-44.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) *Leptospira* and leptospirosis. MediSci, Melbourne.
- Faine S, Adler B, Ruta G (1974) A mechanism of immunity to leptospirosis. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sc.* 1974; 52: 301-310.
- Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, *et al.* (1998) Estandarización de la dosis letal 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev. Cubana Med. Trop.* 50: 22-26.
- González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, González M (2003) Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Rev. Cubana Med. Trop.* 55: 146-152.
- González M, Rodríguez Y, González A, Medina R, Batista N, Ferriol X, *et al.* (2001) Estudio de la protección pasiva

- inducida por el suero de vacunados con vax-SPIRAL® (Vacuna antileptospirósica trivalente) en hamsters frente al desafío con cepas virulentas de *Leptospira Canicola*, Copenhageni y Mozdok. *VacciMonitor* 10: 1-6.
13. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao Reis M, *et al.* (2001) Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect. Immun.* 69: 4958-4968.
 14. Instituto Finlay (1998) Registro Médico-Sanitario vax-SPIRAL® (Vacuna antileptospirósica trivalente). La Habana, Cuba.
 15. Johnson R, Harris V (1967) Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperature. *J. Bacteriol.* 94: 27-31.
 16. Ko A, Galvao Reis M, Ribeiro C, Johnson W, Riley L, and the Salvador Leptospirosis Study Group (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 354: 820-825.
 17. Koizumi N, Watanabe H (2004) Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22: 1545-1552.
 18. Levett P (2001) Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 296-326.
 19. Martínez R, Pérez A, Baró M, Alvarez M, Menéndez J, Díaz M, *et al.* (2000) Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. *Rev. Panam. Salud Publica* 8: 385-392.
 20. Martínez R, Pérez A, Quiñones M, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, *et al.* (2004) Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Panam Salud Publica* 15: 249-255.
 21. Mood A, Graibill F (1978) *Introducción a la teoría estadística*. Ediciones Aguilar, Madrid.
 22. Naiman B, Blumerman S, Alt D, Bolin C, Brown R, Zuerner R, *et al.* (2002) Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: Involvement of WC1⁺ gd and CD4 T cells. *Infect. Immun.* 70: 6147-6157.
 23. Naranjo M, Rodríguez Y, Oliva R, Jauregui U, González M (1999) Esquemas de inmunización en hamsters frente al preparado vacunal antileptospirósico cubano. *Acta Farm. Bonaerense* 18: 121-126.
 24. Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C, Obregón A, Victoria B. Leptospirosis humana en Cuba. Un acercamiento al conocimiento de sus principales reservorios. *Boletín Epidemiológico Semanal del IPK* 2002; vol. 12 N° 1.
 25. Shenberg E, Torten M (1973) A new leptospiral vaccine for use in man. I. Development of a vaccine from *Leptospira* grown in a chemically defined medium. *J. Infect. Dis.* 128: 642-646.
 26. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere J, Andre-Fontaine G (2000) Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 19: 86-94.
 27. Torten M, Shenberg E, Gerichter C, Neuman P, Klingberg M (1973) A new leptospiral vaccine for use in man II. Clinical and serological evaluation of a field trial with volunteers. *J. Infect. Dis.* 128: 647-51.
 28. Trevejo R, Rigan-Perez J, Ashford D, McClure E, Jarquin-Gonzalez C, Amador J, *et al.* (1998) Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J. Infect. Dis.* 178: 1457-1463.
 29. World Health Organization (2000) Leptospirosis, India: report of the investigation of a post-cyclone outbreak in Orissa, November 1999. *Wkly. Epidemiol. Rec. WHO* 75: 217-223.