

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR LA VACUNACIÓN ANTI-LEPTOSPIRA SPP. EN BOVINOS NATURALMENTE EXPUESTOS A LA INFECCIÓN

Federico García¹, Camila Ciuffo¹, Victoria Urioste², Bernardo Lockhart², Camila Hamond^{1,2},

Gustavo Gastal², Alejandro Buschiazzo³, Leticia Zarantonelli¹

1- Unidad Mixta Pasteur + INIA, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

2- Plataforma de Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

3- Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad de una vacuna comercial contra *Leptospira* spp., en vaquillonas Holstein, expuestas a la posible infección natural por la bacteria. Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-leptospira mediante la prueba de microaglutinación (MAT) en sueros de animales vacunados (n=30) y animales control (n=30), obtenidos mensualmente. Se evaluó la respuesta humoral contra los ocho antígenos homólogos incluidos en la vacuna y contra cepas heterólogas aisladas de bovinos en Uruguay. Luego del tercer refuerzo se observó un aumento significativo ($p < 0,0001$) en el título de anticuerpos contra 7 de los 8 serovares homólogos y baja reactividad contra los serovares heterólogos autóctonos.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the immunogenicity of a commercial vaccine against *Leptospira* spp., in Holstein heifers, exposed to a possible natural infection by the bacteria. Anti-leptospira antibody titers were determined by microagglutination test (MAT) in sera from vaccinated animals (n=30) and control animals (n=30), obtained monthly. The humoral response against the eight homologous antigens included in the vaccine and against heterologous strains isolated from cattle in Uruguay was evaluated. After the third boost, a significant ($p < 0.0001$) increase in antibody titer against 7 of the 8 homologous serovars and low reactivity against autochthonous heterologous serovars was observed.

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial. Su agente etiológico son especies patógenas del género *Leptospira* (Picardeau, 2017). En bovinos, la infección aguda puede provocar el nacimiento de terneros débiles, causar su muerte o inducir abortos en vacas preñadas (Ellis, 2015). La infección crónica se asocia a una disminución de índices reproductivos en el rodeo, perpetuando el ciclo de transmisión del agente. Para su control se usan las vacunas formuladas con leptospiras enteras inactivadas (bacterinas) (Adler, 2015). Debido a la variación en la composición del lipopolisacárido (LPS) en la membrana de *Leptospira*, se conocen más de trescientos serovares, que representan una gran diversidad antigénica (Picardeau, 2017). La respuesta humoral inducida por las bacterinas está principalmente dirigida contra el LPS, por lo que distintos serovares generan anticuerpos diferentes. Para un control efectivo de la enfermedad, la OIE recomienda que las vacunas contra leptospirosis incluyan en su formulación sólo cepas representativas de los serovares y genotipos que circulan en una región geográfica (OIE, 2016). Resultados recientes mostraron que sólo dos de las variantes de *Leptospira* spp. que infectan a los rodeos bovinos en Uruguay, están presentes en las vacunas disponibles en el mercado: *L. borgpetersenii* serogrupo (sg) Sejroe serovar (sv) Hardjo y *L. interrogans* sg Canicola sv Canicola (Zarantonelli et al., 2018). El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune provocada por una vacuna comercial en vaquillonas Holstein expuestas a una posible infección natural por *Leptospira* spp.

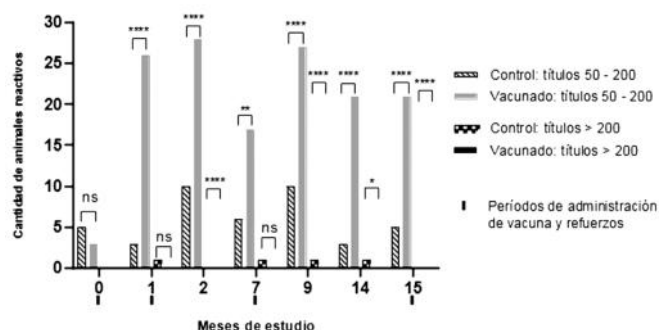
MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en un predio con una prevalencia inicial de infección por especies patógenas de *Leptospira* del 4,5% (con detección en orina de animales adultos por qPCR del gen *lipL32*). Se seleccionaron n=60 vaquillonas Holstein, libres de infección por *Leptospira* spp. de acuerdo a dos pruebas qPCR en orina negativas y sin anticuerpos aglutinantes anti-leptospira detectables por prueba de microaglutinación (MAT) (OIE, 2016). Entre los animales seleccionados, un grupo (n=30) se administró con una vacuna comercial para la prevención de enfermedades reproductivas, incluyendo leptospirosis y otro grupo (n=30) se inoculó con *buffer* fosfato salino (PBS). El plan de vacunación incluyó: una primera dosis entre los 3-8 meses de edad, y tres refuerzos a los meses 1, 7 y 15 post vacunación inicial. Se tomaron muestras de sangre antes de la primera dosis y luego mensualmente hasta los 15 días post última dosis. La inmunogenicidad de la bacteria se evaluó por MAT, determinando títulos de anticuerpos aglutinantes anti-*Leptospira* en suero, utilizando un título de corte de 50. Se asignó un valor de 1 cuando no se observó aglutinación para la dilución de corte. Para realizar el MAT se usaron los siguientes antígenos homólogos (aquellos declarados en la composición de la vacuna evaluada): *L. interrogans* (*L.i*) de serovares Canicola, Hardjo, Wolfii, Pomona, Icterohaemorrhagiae; de la especie *L. borgpetersenii* (*L.b*) sv Hardjo, Tarassovi y de *L. kirschneri* (*L.k*) sv Grippotyphosa. Se evaluaron además títulos de anticuerpos aglutinantes contra antígenos heterólogos, (ausentes en la vacuna), aunque representativos de los serovares aislados de bovinos en Uruguay (Zarantonelli et al., 2018): *L.i* sg Pomona sv Kennewicki; *L. noguchii* (*L.n*) sg Australis, sg Autumnalis, sg Pyrogenes y *L.n* de un serogrupo aún no determinado. Para análisis estadístico se utilizaron la prueba exacta de Fisher y la prueba de comparación múltiple de Tukey o Sidak (ANOVA uni- ó multi-direccional, respectivamente), según el caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego del primer refuerzo, el 87% (26/30) de los animales vacunados mostraron reactividad al menos a uno de los antígenos homólogos, con títulos aglutinantes entre 50 y 200. Se observó un aumento en el título de anticuerpos de los animales vacunados (al menos contra un antígeno homólogo) respecto al grupo control ($p < 0,0001$) luego de la aplicación de cada refuerzo. Se constata una caída en el número de animales reactivos y en los títulos alcanzados en los períodos entre refuerzos. El número más alto de animales con títulos mayores a 200, para al menos un antígeno, se observó luego del segundo y tercer refuerzo (Fig.1). Evaluando individualmente la inmunogenicidad de cada uno de los antígenos homólogos contenidos en la vacuna, *L.b* sv Tarassovi fue el menos inmunogénico pues no se detectaron anticuerpos aglutinantes contra este en ninguno de los muestreos. En cambio, se detectó un aumento significativo de títulos de anticuerpos para los siguientes antígenos homólogos (respecto al grupo control no vacunado): *L.k* sv Grippotyphosa luego del primer ($p = 0,0017$) y tercer refuerzo ($p < 0,0001$); *L.i* sg Pomona sv Pomona después del segundo ($p < 0,001$) y tercer refuerzo ($p < 0,0001$). Para *L.i* sg Sejroe sv Hardjo, *L.b* sg Sejroe sv Hardjo, *L.i* sg Sejroe sv Wolfii, *L. sv* Canicola y *L.i* sv Icterohaemorrhagiae solamente se detectaron diferencias

Figura 1. Inmunoreactividad de animales vacunados (n=30) vs no vacunados (n=30), medida por MAT contra 8 antígenos homólogos a los declarados en la vacuna. ▲ = meses de administración de las dosis de vacuna. Los asteriscos indican diferencias significativas en el número de animales reactivos y títulos de anticuerpos anti-leptospira entre grupo vacunado y grupo control: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ y **** = $p < 0,0001$ (prueba exacta de Fisher).



significativas respecto al grupo control luego del tercer refuerzo ($p < 0,0001$). El nivel de anticuerpos anti-leptospira contra serovares homólogos y heterólogos, luego del tercer refuerzo, está representado en la Figura 2. Respecto a los serovares homólogos, se observó una mayor respuesta en títulos aglutinantes para *L.i* sg Pomona sv Pomona, *L.i* sg Sejroe sv Hardjo y *L.b* sg Sejroe sv Hardjo, sin diferencia significativa entre estos dos últimos antígenos ($p = 0,31$). En cuanto a los serovares heterólogos, los mayores títulos se detectaron contra la variante *L.i* sg Pomona sv Kennewicki. Sin embargo, dichos títulos fueron significativamente menores a los obtenidos contra *L.i* sg Pomona sv Pomona ($p < 0,0001$) (Fig. 2). Esto confirma que los anticuerpos inducidos por la vacuna

son serovar-específicos. Se observó además una muy baja reactividad frente a los serovares autóctonos no incluidos en la vacuna como *L.n* sg Australis y sg Autumnalis; y hubo ausencia de detección de anticuerpos para *L.n* sg Pyrogenes y *L.n* de serogrupo no determinado. Estos resultados invitan a considerar la oportunidad de reformular las vacunas anti-leptospira disponibles en Uruguay, buscando proteger los rodeos bovinos contra variantes de *Leptospiras* spp. circulantes; y eventualmente optimizar el número de antígenos incluidos en las vacunas, para alcanzar su máxima eficacia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Picardeau M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol* 15, 297–307.

Ellis W.A. (2015). Animal leptospirosis. pp.99-137. Springer, Berlin, Heidelberg.

Adler B. (2015). Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 387:251-72.

OIE (2016). Leptospirosis. Manual de La OIE Sobre Animales Terrestres, I (Capítulo 3.1.12), 14p.

Zarantonelli L., Suanes A., Meny P., et al. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(9):e0006694.

Figura 2. Respuesta de anticuerpos aglutinantes en animales vacunados ($n=30$), medida por MAT en unidades de titulación, por dilución seriada de los sueros evaluados contra antígenos correspondientes a serovares de *Leptospira* spp homólogos y heterólogos luego del tercer refuerzo. Las barras corresponden a la media del título de anticuerpos, con los errores estándar de la media indicados. La línea de puntos indica el título de corte (50). NS: no significativo ($p=0,31$) y **** = $p < 0,0001$ (ANOVA unidireccional, prueba de Tukey). ND: serogrupo no determinado.

