

Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum

A. GONZÁLEZ*, R. BORRERO, J. RUIZ, N. BATISTA, Y. FERNÁNDEZ, Y. VALDÉS, M. GONZÁLEZ

Instituto Finlay. Ave 27 N 19805, La Lisa, AP16017, (11600), Ciudad de La Habana, Cuba.

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

RESUMEN

El serogrupo Ballum agrupa cepas de crecimiento fastidioso, con requerimientos nutricionales más exigentes que otras cepas patógenas de *Leptospira*. Fue evaluada la influencia de 37 compuestos nutricionales sobre el crecimiento de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum, tomando como base para el estudio al medio sintético EMJH. El crecimiento microbiano fue estimado espectrofotométricamente y por conteo directo en cámara de Petroff-Hausser. La estabilidad de la virulencia fue evaluada en hamsters mediante el cálculo de la dosis letal media. La estabilidad de la antigenicidad fue evaluada mediante *Western blotting* con antisuero policlonal específico. Bajo condiciones de cultivo controladas se logró triplicar los rendimientos de biomasa comúnmente obtenidos en el medio EMJH sin afectación de la virulencia y antigenicidad tras el incremento de la concentración de Tween 80 y la incorporación de acetato de sodio y extracto de carne. El incremento de la concentración de al menos 6 componentes del EMJH o la incorporación de una variedad de nuevos nutrientes no estimularon apreciablemente los rendimientos de biomasa o la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. Los resultados obtenidos permiten disponer de un medio de cultivo enriquecido capaz de sustentar elevados rendimientos de biomasa de este serogrupo exigente de mayor circulación en humanos en Cuba.

Palabras clave: *Leptospira*, medios de cultivo, crecimiento

ABSTRACT

Modified EMJH medium for cultivation of *Leptospira interrogans* serogroup Ballum. Strains within the Ballum serogroup of spirochete *Leptospira* show fastidious growth with more exigent nutritional requirements than those of other *Leptospira* pathogenic strains. The influence of 37 nutritional compounds on the growth of *Leptospira interrogans* serogroup Ballum was investigated employing the synthetic EMJH medium as the base for the study. Microbial growth was estimated spectrophotometrically and direct counts were performed with a Petroff-Hausser counting chamber. Virulence stability was evaluated by calculating the mean lethal dose in hamsters. Antigenicity stability was evaluated by Western blotting using a specific antiserum. Cell yields commonly obtained in EMJH were triplicated without virulence or antigenicity depletions after culturing in a modified EMJH medium with an increased concentration of Tween 80, and the incorporation of sodium acetate and beef extract. Neither the increased concentration of at least 6 components of EMJH nor the incorporation of a variety of new nutrients stimulated cell yields or the growth rate of the microorganism. The results allow us to make use of an enriched culture medium that promotes high cell yields of this fastidious serogroup most prevalent in humans in Cuba.

Key words: *Leptospira*, culture media, growth

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de amplia distribución mundial causada por espiroquetas patógenas pertenecientes al género *Leptospira*, agrupadas en casi 230 serovares y 24 serogrupos (19). La enfermedad en humanos puede variar desde una infección subclínica hasta un síndrome severo de rápida progresión y elevada mortalidad, o aparecer como grandes brotes en zonas urbanas de países en desarrollo (15, 19). A pesar del enorme interés de la comunidad científica en desarrollar nuevas estrategias de vacunas que garanticen un amplio espectro de protección, las vacunas de células enteras inactivadas continúan siendo en la actualidad la medida inmunoproláctica más eficaz,

con una protección serogrupo específica y de corta duración (19).

Estudios relativamente recientes sugieren la incidencia de al menos 11 serogrupos en humanos en Cuba, y es el serogrupo Ballum la principal causa de la enfermedad en todo el país (25). Ante la actual situación epidemiológica, varias investigaciones se han encaminado hacia la evaluación de la potencialidad vacunal de cepas clínicas autóctonas pertenecientes a este serogrupo de amplia circulación, no incluido en la vacuna trivalente aplicada en la actualidad a grupos humanos de riesgo (9, 10). Algunas de estas investigaciones han revelado el carácter exigente del crecimiento de cepas pertenecientes al serogrupo Ballum en los medios comúnmente utilizados para el cultivo *in vitro* de *Leptospira*, aspecto

que ha sido evidenciado con anterioridad por otros investigadores (26, 28).

En tal sentido, resulta de marcado interés el desarrollo de nuevos medios de cultivo factibles para la producción de vacunas de células enteras para uso humano, que sustenten elevados rendimientos celulares de estas cepas exigentes sin que se vean afectadas otras propiedades importantes, como su virulencia y antigenicidad. El presente trabajo tuvo como objetivos diseñar y evaluar un medio de cultivo factible para el escalado productivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se utilizó en el estudio la cepa candidata vacunal 42600 de *Leptospira interrogans* s.l. serogrupo Ballum, aislada en el año 2000 en la provincia de Holguín por hemocultivo de un paciente con sintomatología compatible con leptospirosis, y que fue posteriormente donada al Instituto Finlay por el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de la citada provincia. Se incluyó como control de crecimiento en algunos ensayos la cepa vacunal 87 de *Leptospira interrogans* s.l. serogrupo Canicola, originalmente aislada de muestras animales remitidas al Centro Nacional de Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana. Las cepas fueron conservadas en medio semisólido de Fletcher (5) y mantenidas rutinariamente en medio EMJH (5) bajo condiciones estáticas a 28-30 °C. La virulencia fue mantenida a través de pases periódicos en hámsteres, según los métodos descritos (5).

Inóculo y condiciones de cultivo

En todos los estudios nutricionales se emplearon como inóculos cultivos en fase exponencial crecidos en medio EMJH (Albumina A8022, Sigma) bajo condiciones controladas (30 °C, 130 rpm). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado empleando erlenmeyers de 250 ml de capacidad, con 50 ml de medio fresco inoculado hasta una concentración microbiana inicial de $3-4 \times 10^8$ células/ml. Tras la inoculación, los cultivos fueron incubados durante 6 días bajo condiciones controladas de temperatura y agitación (30 °C, 130 rpm).

Compuestos nutricionales

Tomando como base el medio sintético EMJH, se evaluó la influencia sobre el crecimiento de la cepa 42600 de Ballum de un incremento en la concentración de 7 compuestos nutricionales presentes en el referido medio de cultivo, así como la incorporación de 30 nuevos compuestos (Tabla 1). La influencia de cada compuesto nutricional fue evaluada de forma individual adicionando concentraciones crecientes del mismo al medio EMJH, para lo cual fueron preparadas en el momento soluciones madres a concentraciones apropiadas empleando agua destilada estéril. Cada solución madre fue ajustada a pH 7,0-7,2, esterilizada mediante filtración (0,2 µm) e incorporada al medio de cultivo asépticamente. En los casos de interés, se evaluó el efecto sinérgico de dos o más nutrientes simultáneamente.

Evaluación del crecimiento

El crecimiento fue estimado espectrofotométricamente (Ultrospec III, Amersham) cada 24 horas durante 6 días, tomando muestras asépticamente. En varios casos se determinó la concentración microbiana mediante conteo directo en cámara de Petroff-Hausser y se calcularon parámetros del crecimiento microbiano, como velocidad de crecimiento específica y tiempo de duplicación, según las fórmulas descritas (21). Fueron eva-

Tabla 1. Compuestos evaluados y rango de concentraciones ensayadas durante los estudios nutricionales.

Compuesto nutricional	Rango de concentración (mg/ml)
Tween 80 ⁽¹⁾	1,25-3,75
Cloruro de amonio ⁽¹⁾	0,25-2,00
Sulfato de hierro ⁽¹⁾	0,05-0,30
Piruvato de sodio ⁽¹⁾	0,10-1,00
Glicerol ⁽¹⁾	0,10-3,20
Tiamina ⁽¹⁾	0,005-0,02
Cianocobalamina ⁽¹⁾	0,0002-0,008
Tween 60	0-1,5
Tween 40	0-1,5
Extracto de levadura	0-8,0
Extracto de carne	0-8,0
Peptona de carne	0-8,0
Peptona de caseína	0-8,0
Proteosa peptona	0-8,0
Triptosa	0-8,0
Suero de conejo ⁽²⁾	0-10
Suero de carnero ⁽²⁾	0-10
Suero fetal bovino ⁽²⁾	0-10
Hemoglobina bovina	0-0,064
Hemina bovina	0-0,064
NAD	0-0,064
Pantotenato de calcio	0-0,01
Acido p-aminobenzoico	0-0,0004
Riboflavina	0-0,008
Acido glutámico	0-1,0
Acido aspártico	0-1,0
Asparagina	0-1,0
Lisina	0-1,0
Isoleucina	0-1,0
Glicina	0-1,0
Cisteína	0-1,0
Serina	0-1,0
Arginina	0-1,0
Glucosa	0-0,4
Acetato de sodio	0-0,4
Glutión	0-0,2
Sulfato de manganeso	0-0,2

⁽¹⁾ Componentes del medio EMJH evaluados

⁽²⁾ Concentración ensayada, en % v/v

luadas además características culturales, como motilidad y uniformidad celular (posible aparición de células alargadas o pleomorfismo), mediante observación directa bajo el microscopio de campo oscuro. Se realizaron controles de pureza en todos los cultivos mediante siembra en caldo tripteína de soja y caldo tioglicolato. Los resultados de la estimación del crecimiento fueron comparados estadísticamente mediante el Test de Duncan, con un nivel de significación $\alpha=0,05$ (18).

Evaluación de la virulencia

La estabilidad de la virulencia de la cepa tras cada cambio nutricional se evaluó mediante la metodología propuesta por

González *et al.*, empleando hámsteres sirios dorados de 45-50 g de peso (8). En los casos de interés, se evaluó cuantitativamente la virulencia mediante el cálculo de la dosis letal media, según la metodología propuesta por Fajardo *et al.* (6).

Preparación de antisuero específico en conejos

Se elaboró un antisuero policlonal específico para la cepa 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum crecida en medio EMJH. Conejos Nueva Zelanda adultos, de 1,5-2 kg de peso, fueron inmunizados con 1 ml de una suspensión (10^9 células) de leptospiras lavadas y resuspendidas en tampón fosfato salino estéril pH 7,2 (TFS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10mM), sonicadas y mezcladas con igual volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma). El inmunógeno así preparado fue dividido en volúmenes iguales y aplicado en dos sitios por vía intramuscular y en otros dos por vía subcutánea. Tras 4 y 8 semanas desde la primera inmunización, se aplicó una segunda y una tercera inmunización con 1 ml de sonicado de células (10^9 células) mezclado con igual volumen de adyuvante incompleto de Freund; en ambos casos se utilizó la misma vía combinada intramuscular-subcutánea. Transcurridos 14 días después de la última inmunización, los animales fueron sangrados por punción intracardiaca.

Evaluación de la antigenicidad

La estabilidad en la expresión de los principales antígenos inmunorrelevantes tras el cultivo reiterado en medio EMJH modificado se evaluó mediante la técnica de *Western blotting* según el procedimiento previamente descrito (9), con ligeras modificaciones. Brevemente, muestras de 8×10^6 células fueron solubilizadas en tampón de lisis con 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol y 2% dodecil sulfato de sodio (SDS). Las muestras así tratadas fueron mantenidas durante toda la noche a 4 °C y luego separadas mediante SDS-PAGE empleando un gel separador al 12,5%. Luego de la separación de las proteínas, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie y analizados mediante analizador de imágenes (ImageMaster VDS, Amersham) o transferidos a membrana de nitrocelulosa. Para la detección antigénica, la nitrocelulosa fue bloqueada con leche descremada al 3% en TFS y luego incubada durante 2 horas con antisuero de conejo diluido 1:100 en solución de bloqueo con 0,05% de Tween 20. Para la visualización de las bandas, se incubó una hora con conjugado proteína A-peroxidasa (Sigma) y luego se aplicó el sustrato de la enzima.

RESULTADOS

Estudios nutricionales

Los estudios nutricionales realizados tuvieron como base el medio sintético EMJH. Al analizar la cinética de crecimiento de la cepa 42600 en ese medio bajo condiciones de cultivo controladas, empleando como inóculo un cultivo joven crecido en el mismo medio y bajo las mismas condiciones, se apreció una ausencia de fase de latencia; sin embargo, el crecimiento exponencial se extendió solamente hasta el tercer día de incubación y alcanzó la mitad del rendimiento de biomasa logrado por una cepa del serogrupo Canicola bajo las mismas condiciones de cultivo. Los escasos rendimientos alcanzados por la cepa del serogrupo Ballum con el cultivo en medio EMJH fueron independientes de la talla de inóculo empleada, obteniéndose rendimientos similares con inóculos del 20 al 50% del volumen final del cultivo (datos no mostrados).

Fue evaluada la influencia sobre el crecimiento de Ballum de un incremento de la concentración de 7 componentes del medio EMJH incluyendo la fuente principal de carbono y energía (Tween 80), la fuente de nitrógeno (NH_4Cl), la fuente de hierro (FeSO_4) y los factores de crecimiento glicerol, piruvato de sodio, tiamina (B_1) y cianocobalamina (B_{12}). Sólo el incremento de la concentración de la fuente de carbono desde 1,25 mg/ml (utilizada para el EMJH) hasta 3 mg/ml produjo un aumento significativo de los rendimientos celulares finales sin incidir sobre otras características culturales, como motilidad y uniformidad celular. Un incremento adicional de la concentración de Tween 80 condujo a una disminución de los rendimientos celulares, con la aparición de células muertas y abundantes detritos. Este efecto citotóxico fue generalizado al incorporar concentraciones de la fuente de carbono mayores de 3,25 mg/ml (Figura 1). El incremento de la concentración del resto de los componentes del medio EMJH evaluados no influyó significativamente en los rendimientos celulares finales ni en la velocidad específica de crecimiento de la cepa.

Al evaluar la influencia de otras fuentes de carbono reportadas para *Leptospira*, como los polisorbatos de ácido esteárico (Tween 60) y de ácido palmítico (Tween 40), se apreció un efecto similar al registrado con el polisorbato de ácido oleico (Tween 80). La incorporación al medio EMJH de Tween 60 hasta 1 mg/ml o Tween 40 hasta 1,25 mg/ml condujo a un incremento significativo de los rendimientos de biomasa, aunque las características culturales fueron cualitativamente inferiores a las mostradas por la cepa cultivada con Tween 80 como única fuente de carbono y energía, ya que se observó una disminución de la motilidad y un incremento de células largas o pleomorfismo. Concentraciones superiores a las citadas determinaron una disminución del rendimiento de biomasa y un incremento de células muertas en el cultivo. Fueron evaluadas, además, varias mezclas de Tween 80/60 y 80/40 en diferentes proporciones como

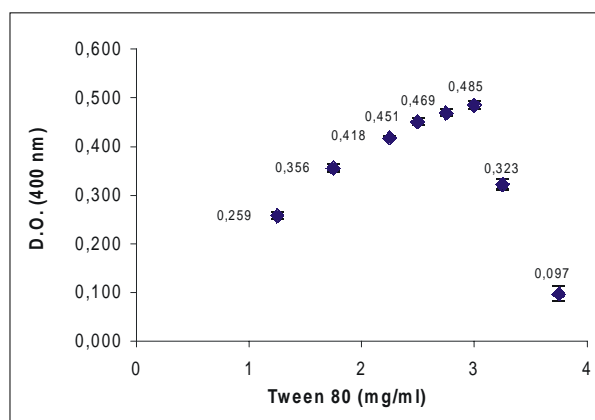


Figura 1. Influencia del incremento en la concentración de Tween 80 en el medio EMJH sobre los rendimientos finales de biomasa de la cepa 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum.

fuelle de carbono y energía. Ninguna de las mezclas de polisorbatos ensayadas fue superior al Tween 80 como única fuente de ácidos grasos para el cultivo de la cepa 42600 de Ballum (datos no mostrados).

La incorporación de suero de conejo o de carnero al medio EMJH estimuló ligeramente el crecimiento de la cepa de Ballum, sin llegar a alcanzar los rendimientos obtenidos con el incremento de Tween 80. En ambos casos no se registró efecto citotóxico, al menos hasta la incorporación de un 10% de suero, aunque por encima de un 5% comenzaron a aparecer células largas o pleomorfismo. El efecto estimulador de ambos suplementos nutricionales no pudo ser equiparado con su sustitución por suero fetal bovino o con la incorporación de una variedad de factores de crecimiento séricos como hemoglobina, hemina o dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD). Tampoco la incorporación de vitaminas y coenzimas, como ácido pantoténico, ácido-p-aminobenzoico o riboflavina; de azúcares, como glucosa; ni de agentes antioxidantes, como glutatión y $MnSO_4$, estimularon apreciablemente el crecimiento de la cepa candidata vacunal de Ballum.

Un significativo incremento de los rendimientos celulares fue observado tras la incorporación al medio EMJH de concentraciones crecientes de acetato de sodio. La adición de este nutriente estimuló el rendimiento de biomasa de forma proporcional a la concentración hasta 0,2 mg/ml, a partir de la cual un incremento adicional no repercutió apreciablemente en los rendimientos obtenidos; no obstante, no se observó efecto citotóxico, al menos hasta 0,4 mg/ml. El efecto estimulador del acetato de sodio fue aún más evidente tras su incorporación al medio EMJH previamente modificado por un incremento de la concentración de Tween 80 hasta 2,75 mg/ml (Figura 2). Los rendimientos de biomasa alcanzados con la adición de ambos nutrientes a la vez fueron muy superiores a aquellos logrados con la adición de uno u otro nutriente de forma individual.

La incorporación al medio EMJH de complejos orgánicos ricos en factores de crecimiento, como el extracto de levadura o de carne, así como una variedad de fuentes de nitrógeno, como peptona de carne, peptona de caseína, triptosa, proteosa peptona o aminoácidos libres, no estimularon el crecimiento de Ballum. Sin embargo, al incorporar al medio EMJH previamente modificado con Tween 80 (2,75 mg/ml) y acetato de sodio (0,2 mg/ml) concentraciones crecientes de fuentes orgánicas de nitrógeno, como extracto de carne o proteosa peptona, se observó un significativo incremento de los rendimientos celulares finales (Figura 3). Este marcado efecto estimulador del crecimiento no se obtuvo sustituyendo las fuentes de nitrógeno orgánicas anteriores por fuentes inorgánicas, como NH_4Cl , como así tampoco por la adición de al menos 9 aminoácidos individuales o la mezcla de ellos (Figura 4).

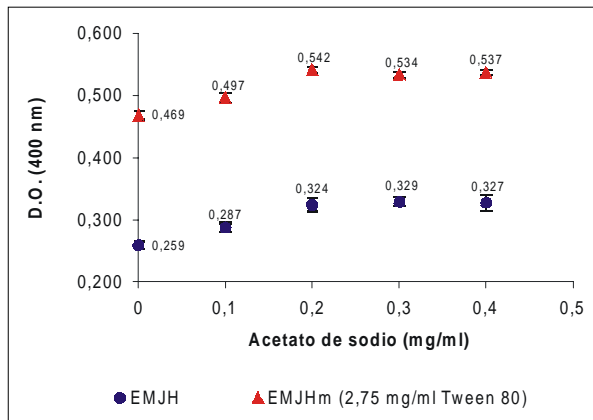


Figura 2. Efecto de la incorporación de acetato de sodio a los medios EMJH y EMJH modificado (2,75 mg/ml de Tween 80) sobre los rendimientos finales de biomasa de la cepa 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum.

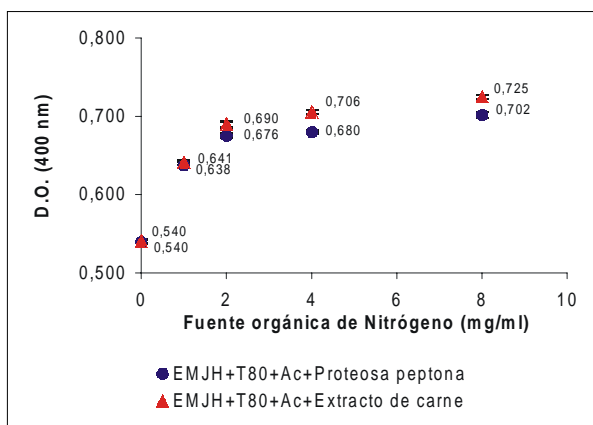


Figura 3. Efecto de la incorporación de fuentes orgánicas de nitrógeno sobre el crecimiento de la cepa 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en el medio EMJH modificado (2,75 mg/ml Tween 80 + 0,2 mg/ml acetato de sodio), con el agregado de extracto de carne o proteosa peptona.

Los estudios nutricionales realizados permitieron la definición de un medio de cultivo cualitativamente superior al medio EMJH para el crecimiento de la cepa candidata vacunal 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum, que incluyó la adición de Tween 80 hasta 2,75 mg/ml y la incorporación de 0,2 mg/ml de acetato de sodio y 8 mg/ml de extracto de carne; este medio de cultivo fue utilizado en ulteriores ensayos de estabilidad de la virulencia y antigenicidad de la cepa. Cada una de las modificaciones realizadas al medio EMJH condujeron a incrementos significativos de los rendimientos de biomasa con respecto a la variante anterior que le dio origen (Tabla 2). Por otro lado, el cultivo de la cepa 42600 de Ballum en medio EMJH modificado permitió alcanzar parámetros de crecimientos similares a los logrados por la cepa vacunal 87 del serogrupo Canicola cultivada en medio EMJH (Tabla 3).

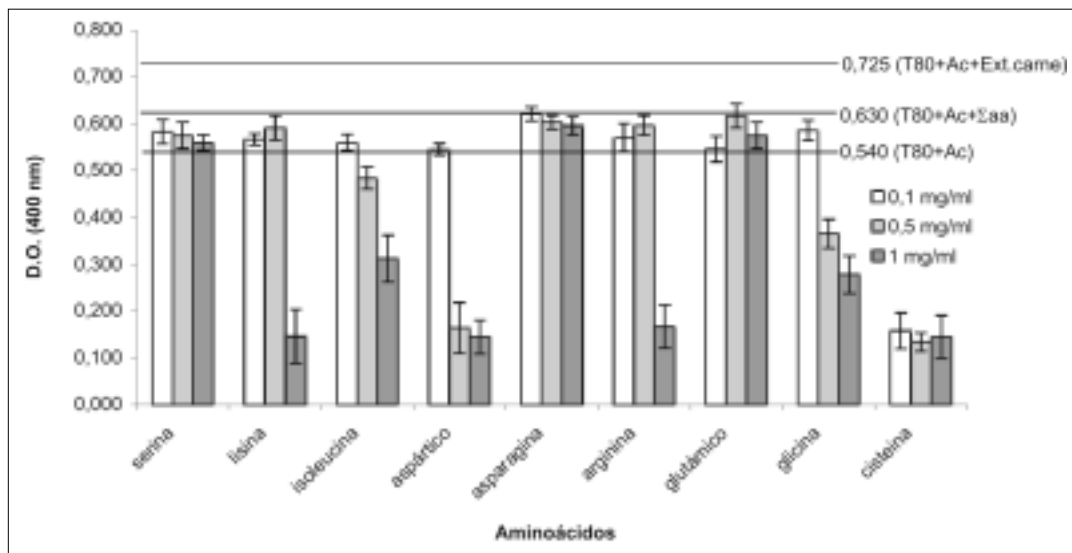


Figura 4. Efecto de la incorporación de aminoácidos sobre el crecimiento de la cepa 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en el medio EMJH modificado (2,75 mg/ml Tween 80 + 0,2 mg/ml acetato de sodio). Las líneas horizontales indican los valores medios de densidad óptica alcanzados por los controles de crecimiento incorporados en el ensayo: T80+Ac (EMJHm: 2,75 mg/ml Tween 80 + 0,2 mg/ml acetato de sodio), T80+Ac+Saa (EMJHm: 2,75 mg/ml Tween 80 + 0,2 mg/ml acetato de sodio + 0,1 mg/ml de cada aminoácido testado), T80+Ac+Carne (EMJHm: 2,75 mg/ml Tween 80 + 0,2 mg/ml acetato de sodio + 8 mg/ml de extracto de carne).

Tabla 2. Rendimientos de biomasa alcanzados por la cepa 42600 de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en diferentes variantes del medio EMJH

Medio de cultivo	Rendimiento de biomasa (células/ml) ⁽¹⁾	<i>P</i> ⁽²⁾
EMJH	1,84 · 10 ⁹	
EMJHm (T80)	3,01 · 10 ⁹	2,23 · 10 ⁻⁴
EMJHm (T80+Ac)	3,66 · 10 ⁹	2,62 · 10 ⁻⁴
EMJHm (T80+Ac+ Ext. carne)	5,52 · 10 ⁹	2,23 · 10 ⁻⁴

T80: a concentración final 2,75 mg/ml.

Ac: acetato de sodio a concentración final 0,2 mg/ml.

Ext. carne: extracto de carne a concentración final 8 mg/ml.

⁽¹⁾ Medias geométricas de al menos tres réplicas cultivadas bajo condiciones controladas de temperatura y agitación (30 °C, 130 rpm).

⁽²⁾ Análisis estadístico según Test de Duncan.

Tabla 3. Velocidad de crecimiento específica (μ) y tiempo de duplicación (Td) alcanzados por las cepas 42600 y 87 de *Leptospira interrogans* en diferentes variantes del medio EMJH

Cepa/Medio de cultivo	μ (· 10 ⁻² h ⁻¹) ⁽¹⁾	Td (h) ⁽²⁾
87 Canicola/EMJH	3,6	19
42600 Ballum/EMJH	1,8	38
42600 Ballum/EMJHm (T80)	2,3	30
42600 Ballum/EMJHm (T80+Ac)	2,7	26
42600 Ballum/EMJHm (T80+Ac+Ext. carne)	3,7	18

T80: a concentración final 2,75 mg/ml.

Ac: acetato de sodio a concentración final 0,2 mg/ml.

Ext. carne: extracto de carne a concentración final 8 mg/ml.

⁽¹⁾ Velocidad específica de crecimiento microbiano, $\mu = \ln(N-N_0)/t$.

⁽²⁾ Tiempo de duplicación de la población microbiana, $Td = \ln 2/\mu$.

Estabilidad de la virulencia

Ninguno de los nutrientes incorporados al medio EMJH, independientemente de su efecto sobre el crecimiento, afectó la capacidad de la cepa 42600 de producir infección letal en el modelo hámster sirio dorado. Tampoco se registró disminución de la dosis letal media tras varios subcultivos sucesivos en medio EMJH modificado, mediante el incremento de la concentración de Tween 80 (hasta 2,75 mg/ml) y la incorporación de 0,2 mg/ml de acetato de sodio y 8 mg/ml de extracto de carne.

Estabilidad de la antigenicidad

El cultivo reiterado de la cepa 42600 en el medio EMJH modificado no produjo alteración en la expresión de los

principales antígenos inmunorrelevantes según la técnica de *Western blotting*, empleando para la detección un antisuero policlonal específico producido en conejos previamente inmunizados con la cepa crecida en el medio EMJH (Figura 5).

DISCUSIÓN

El serogrupo Ballum agrupa cepas de crecimiento fastidioso, con requerimientos nutricionales más exigentes que otras cepas patógenas de *Leptospira* (5, 9, 26, 28). Los escasos rendimientos alcanzados por la cepa candidata vacunal 42600 del serogrupo Ballum en el medio EMJH confirman el hecho de que este medio sintético,

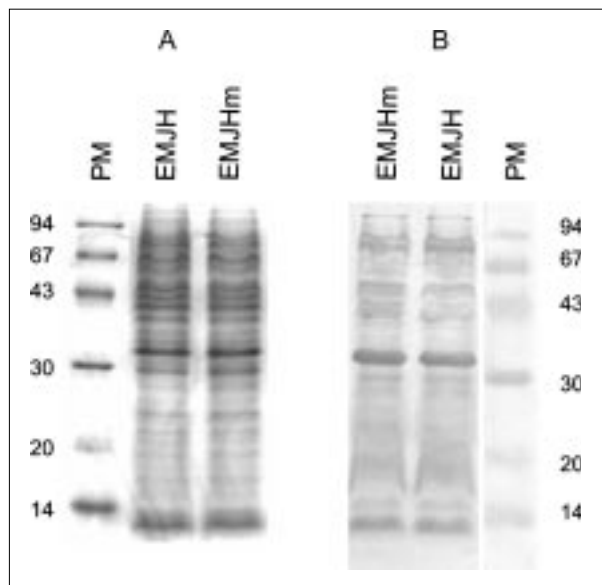


Figura 5. Estabilidad de la expresión antigénica de la cepa 42600 tras el cultivo reiterado en el medio EMJH modificado (2,75 mg/ml Tween 80 + 0,2 mg/ml acetato de sodio + 8 mg/ml extracto de carne). (A) Análisis mediante SDS-PAGE (12,5%) de lisado de células completas crecidas en EMJH y en EMJH modificado. (B) *Western blotting* frente a antisuero policlonal específico a cepa 42600 crecida en EMJH; PM: patrón de peso molecular (Amersham).

actualmente el más utilizado para el cultivo de cepas de *Leptospira*, resulta inapropiado para el escalado productivo de una vacuna de células enteras de este serogrupo exigente, de mayor circulación en humanos en Cuba. Por ello se torna necesario el diseño y la evaluación de un medio enriquecido, que permita alcanzar los rendimientos de biomasa requeridos para la producción.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la importancia de los ácidos grasos de cadena larga en el metabolismo de *Leptospira*, los cuales no sólo constituyen la principal fuente de carbono y energía, sino que además son requeridos como fuente exógena de lípidos dado que *Leptospira* no es capaz de sintetizar ácidos grasos *de novo* (5, 12-14). Los resultados de nuestras evaluaciones con el serogrupo Ballum son comparables a los reportados anteriormente para cepas del serogrupo Pomona, donde se observó una estimulación del crecimiento al incrementar la concentración de Tween 80 en el medio EMJH, manteniendo constante la concentración de albúmina bovina (8). Ambos estudios sugieren que en el medio EMJH la capacidad destoxicante de la albúmina no ha sido completamente saturada y que un incremento de la concentración de ácidos grasos hasta determinados niveles y bajo condiciones de cultivo controladas, lejos de tener un efecto citotóxico, estimula el crecimiento celular. Un incremento de la concentración de otros macronutrientes del medio EMJH, como las fuentes de nitrógeno y de hierro, no estimularon apreciablemente el rendimiento de biomasa ni la velocidad especí-

fica de crecimiento, lo cual sugiere que estos nutrientes no limitan el crecimiento de la cepa en estudio o que las fuentes utilizadas para su suministro no son mayormente asimiladas al aumentar su concentración. De la misma forma, los resultados sugieren la presencia en el medio EMJH de concentraciones saturantes de factores de crecimiento como vitaminas B₁ y B₁₂, piruvato de sodio y glicerol.

A pesar de que el medio EMJH presenta como única fuente de ácidos grasos de cadena larga al Tween 80, algunos autores recomiendan el empleo de una mezcla de polisorbatos para el crecimiento de cepas exigentes de *Leptospira* (4). La incorporación de Tween 60 y 40 al medio EMJH hasta niveles no citotóxicos estimuló el crecimiento de la cepa Ballum; sin embargo, la adición de estos polisorbatos no superó los rendimientos de biomasa ni las cualidades del cultivo alcanzadas por la cepa con una concentración incrementada de polisorbato de ácido oleico (Tween 80) como única fuente de carbono. Algunos investigadores plantean que los ácidos grasos insaturados como el oleico soportan un crecimiento superior que variantes saturadas con similar número de átomos de carbono (esteárico, palmítico) a la misma concentración (29).

Otras fuentes suplementarias de ácidos grasos de cadena larga utilizadas por *Leptospira* las constituyen los sueros animales, los que además son ricos en factores de crecimiento. Entre los más comúnmente empleados se encuentran el suero de conejo, constituyente esencial de los primeros medios de cultivo desarrollados para este microorganismo, como los de Fletcher, Korthof y Stuart (7, 16, 30), y el suero de carnero (24). El ligero efecto estimulador del crecimiento observado con ambos suplementos nutricionales puede deberse a su aporte adicional de ácidos grasos de cadena larga, más que a otros factores de crecimiento presentes, dado que los resultados obtenidos no fueron equiparados con la incorporación de factores de crecimiento séricos o con suero fetal bovino.

Ha sido tradicionalmente reconocido que *Leptospira* no es capaz de utilizar azúcares como fuente de carbono y energía (5, 11), a pesar de haber sido demostrada recientemente la presencia de todos los genes necesarios para la vía glicolítica (22). Los mismos autores sugieren que las dificultades en la utilización de la glucosa por este microorganismo radican en la ineficiencia de los mecanismos de transporte hacia el interior celular. Sin embargo, algunos investigadores han planteado que la adición de glucosa al medio de cultivo promueve el crecimiento de algunas cepas de *Leptospira* (3). Los resultados de nuestras evaluaciones no evidenciaron una estimulación del crecimiento de la cepa de Ballum al incorporar glucosa al medio EMJH.

Estudios recientes confirmaron la ausencia de genes para superóxido dismutasas en cepas de *Leptospira* (22). Esta deficiencia quizá conduzca al microorganismo hacia

un estrés oxidativo por acumulación de radicales superóxido formados durante la respiración aerobia, especialmente en condiciones de cultivo aireadas, como las empleadas en nuestros ensayos. La incorporación al medio de cultivo de agentes antioxidantes secuestradores de aniones superóxido, como el glutatión (20) o el $MnSO_4$ (31), recomendados para otros microorganismos exigentes, no tuvo un efecto apreciable sobre el crecimiento de esta cepa. Estos resultados tienden a corroborar la hipótesis sobre la existencia en *Leptospira* de mecanismos alternativos a las superóxido dismutasas, como las metaloporfirinas (22).

Un marcado efecto estimulador del crecimiento se obtuvo al incorporar acetato de sodio al medio EMJH. Dada la naturaleza aerobia estricta del metabolismo de *Leptospira* (5, 11), el efecto estimulador del acetato de sodio se explica teniendo en cuenta que el mismo constituye una fuente adicional de acetil-CoA, vía de entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (17), aun cuando el aporte principal de esta molécula en *Leptospira* lo brinda la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (5, 22, 23). Por otro lado, algunos microorganismos fermentadores de ácidos grasos, como *Clostridium kluyveri*, utilizan acetato en un mecanismo indirecto para la activación de los ácidos grasos (17). En tal sentido, algunos investigadores han sugerido la incorporación de acetato de sodio a los medios de cultivo de *Leptospira* (1). Un aporte adicional de acetil-CoA, al incrementar la concentración de piruvato de sodio, uno de los factores de crecimiento de *Leptospira* presentes normalmente en el medio EMJH, podría haber resultado en un efecto favorable. Sin embargo, el incremento de la concentración de piruvato en al menos 10 veces no estimuló apreciablemente ni los rendimientos de biomasa ni la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. Este resultado puede deberse a la fuerte regulación negativa a la que es sometido el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa en presencia de elevados niveles de ATP (17). Al parecer, la energía en forma de ATP liberada por la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga es suficiente para producir la inhibición o disminución de la actividad enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa, lo cual no ocurre con la acetil-CoA sintetasa, enzima responsable de generar Acetil-CoA a partir de acetato libre.

Ha sido reconocido que *Leptospira* es capaz de sintetizar todos los aminoácidos esenciales a partir de una fuente inorgánica de nitrógeno como las sales de amonio (2, 5) y, de hecho, el NH_4Cl constituye la única fuente de nitrógeno presente en el medio EMJH. En contraste con otras espiroquetas patógenas, como *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum*, *Leptospira* presenta los genes de todos los sistemas enzimáticos implicados en la biosíntesis de aminoácidos (23). Sin embargo, algunos autores recomiendan la incorporación de fuentes orgánicas como extracto de carne (7) o aminoácidos (29), a

pesar de que estos últimos no logran satisfacer por sí solos los requerimientos de nitrógeno en muchas cepas patógenas (5, 11, 29). Los resultados de nuestros estudios sugieren que un incremento de la concentración de nitrógeno inorgánico no es mayormente asimilado por cepas pertenecientes al serogrupo Ballum en un medio con una proporción no balanceada de carbono/nitrógeno, como el medio EMJH modificado por un incremento de Tween 80. Sin embargo, este desequilibrio logró revertirse suministrando una mezcla rica en aminoácidos libres, dipéptidos y péptidos de bajo peso molecular, entre otros nutrientes aportados por el extracto de carne o la proteosa peptona. *Leptospira* posee una variedad de transportadores en la membrana específicos para el transporte de aminoácidos libres, dipéptidos y péptidos de bajo peso molecular (23), que le permiten la asimilación simultánea de una gran gama de moléculas nitrogenadas con el consiguiente ahorro energético que ello presupone. Además del elevado aporte nutricional, estas fuentes tal vez ejerzan un efecto destoxicante y estabilizador sobre los ácidos grasos libres, de forma similar a lo que ocurre con la albúmina bovina, lo cual podría estar contribuyendo al notable incremento de la velocidad específica de crecimiento observado tras su incorporación.

Los estudios nutricionales realizados en este trabajo permiten disponer de una variante de medio EMJH enriquecido, que incluye el incremento de la concentración de Tween 80 hasta 2,75 mg/ml y la incorporación de acetato de sodio a una concentración de 0,2 mg/ml y de extracto de carne a una concentración de 8 mg/ml, manteniendo constante las concentraciones del resto de los componentes del medio EMJH. Esta variante de medio proteico enriquecido permitió triplicar los rendimientos de biomasa comúnmente alcanzados por la cepa 42600 de Ballum en el medio EMJH bajo las mismas condiciones de cultivo. El cultivo reiterado en el medio modificado no conllevó a una disminución de la virulencia, según los resultados de la dosis letal media en el modelo hámster sirio dorado. De la misma forma, se mantuvo inalterada la expresión de los principales antígenos inmunorrelevantes, según la técnica de *Western blotting*, con un antisuero policlonal específico producido en conejos con la cepa crecida en medio EMJH. Es necesario destacar que el medio de cultivo propuesto ha sido diseñado para alcanzar elevados rendimientos celulares bajo condiciones de cultivo controladas, empleando un inóculo en fase exponencial crecido bajo las mismas condiciones. Dada la alta concentración de ácidos grasos libres presentes en el medio modificado, el mismo no se recomienda para cultivos estáticos o para cultivos agitados cuyos inóculos provengan de cultivos estáticos. En cualquier caso, las células expuestas a tan altas concentraciones de Tween 80 deberán presentar una elevada tasa metabólica que les permita una óptima asimilación del nutriente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adler B, Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J Hyg Camb* 1980; 84: 1-10.
2. Charon N, Johnson RC, Peterson D. Amino acid bio-synthesis in the spirochete *Leptospira*: evidence for a novel pathway of isoleucine biosynthesis. *J Bacteriol* 1974; 117: 203-11.
3. Ellinghausen HC. Stimulation of leptospiral growth by glucose. *Am J Vet Res* 1968; 29: 191-9.
4. Ellis WA, Montgomery JM, Cassells JA. Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Res Vet Sc* 1986; 39: 292-5.
5. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne, MediSci, 1999, p. 29-43.
6. Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, *et al*. 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* 1998; 50: 22-6.
7. Fletcher W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1928; 21: 265-82.
8. González A, Batista N, Valdés Y, González M. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar *mozdok* en medio EMJH modificado. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54: 32-6.
9. González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, González M. Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55: 146-52.
10. González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, Núñez JF, González M. Efecto *booster* de una inmunización activa con *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum en hámsters vacunados con vax-SPIRAL®. *VacciMonitor* 2003; 12: 1-6.
11. Johnson RC, Faine S. *Leptospira*. En: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, p. 62-7.
12. Johnson RC, Gary ND. Nutrition of *Leptospira pomona*. II. Fatty acid requirements. *J Bacteriol* 1963; 85: 976-82.
13. Johnson RC, Harris VD, Walby J. Characterization of leptospire according to their fatty acid requirements. *J Gen Microbiol* 1969; 55: 399-407.
14. Johnson RC, Livermore BP, Walby J, Jenkins HM. Lipids of parasitic and saprophytic leptospire. *Infect Immun* 1970; 2: 286-91.
15. Ko AI, Galvao M, Ribeiro CM, Johnson WD, Riley LW, Group T.S.L.S. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 1999; 354: 820-5.
16. Korthof G. Experimentalles schlammfieber beim menschen. *Zentr Bakteriol Parasitenk Abt I Orig A* 1932; 125: 429.
17. Lehninger AL. *Bioquímica*. Barcelona, Ediciones Omega S. A., 1979, p. 453-568.
18. Lerch G. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. La Habana, Editorial Científico Técnica, 1977, p. 14-22.
19. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-326.
20. Li Y, Hugenholtz J, Abee T, Molenaar D. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5739-45.
21. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid, Prentice Hall Iberia, 1999, p. 149-177.
22. Nascimento A, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, *et al*. Comparative genomics of *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol* 2004; 186: 2164-72.
23. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, *et al*. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003; 422: 888-93.
24. Rodríguez IA, Fors ME, Puentes J, Mas M. Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de *Leptospira* sp. *Rev Cubana Med Militar* 1998; 27: 44-8.
25. Rodríguez I, Obregón AM, 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: 11-5.
26. Rule PL, Aaron DA. Gellan gum as a substitute for agar in leptospiral media. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 500-4.
27. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 1996; 64: 2322-30.
28. Shenberg E. Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *J Bacteriol* 1966; 93: 1598-606.
29. Stalheim OHV, Wilson JB. Nutrition of *Leptospira canicola*. *J Bacteriol* 1964; 88: 48-54.
30. Stuart RD. The preparation and use of a simple culture medium for *Leptospira*. *J Pathol Bacteriol* 1946; 58: 343-9.
31. Tseng HJ, Mc Ewan AG, Jennings MP. Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Mol Microbiol* 2001; 40: 1175-86.