

INSTITUTO FINLAY

Conservación de cepas vacunales de *Leptospira* a -70 °C

Lic. Reinier Borrero Maura,¹ MC. Andrés González Rodríguez,² MC. Carmen del Puerto Sardiñas,³ Ing. Niurka Batista Santiesteban⁴ y Téc. Yolanda Valdés Abreu⁵

RESUMEN

Se evaluó la crioconservación a -70 °C con 9 variantes de crioprotectores como método de conservación de las cepas de *Leptospira interrogans*, utilizadas como antígenos en la vacuna antileptospirosis vax-SPIRAL®. La viabilidad se evaluó periódicamente según el rendimiento celular alcanzado por las cepas recién descongeladas en medio EMJH. La estabilidad de la virulencia fue estimada en hámster. La antigenicidad antes y después de la crioconservación fue comparada mediante microaglutinación frente a antiseros de referencia. Solo el empleo de dimetilsulfóxido a 2,5 y 5 % o leche descremada 5 % como agentes crioprotectores permitió una rápida recuperación de las 3 cepas tras 7 meses de crioconservación sin afectación de su virulencia y antigenicidad, mientras el glicerol tuvo un efecto variable sobre el grado de recuperación de las cepas evaluadas. Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de la crioconservación a -70 °C con un apropiado agente crioprotector como método de conservación de cepas vacunales de *Leptospira*.

Palabras clave: *Leptospira interrogans*, cepas vacunales, crioconservación.

La vacuna antileptospirosis trivalente vax-SPIRAL® es una suspensión de células inactivadas de 3 cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* pertenecientes a los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok.¹ Dada la reconocida disminución de la antigenicidad con la atenuación de la virulencia de este microorganismo,² resulta indispensable la disponibilidad de cultivos altamente virulentos para ser utilizados como semillas en el proceso productivo o para los ensayos de potencia de la vacuna en modelos animales. De manera tradicional las cepas vacunales de *Leptospira* son conservadas en un medio semisólido con suero de conejo como constituyente esencial, que potencialmente garantiza su viabilidad durante pocos meses sin necesidad de frecuentes subcultivos que contribuyen a la disminución de la

virulencia. De forma periódica el microorganismo es inoculado y reaislado de animales de laboratorio susceptibles, para emplear el sistema inmune animal como mecanismo de selección de las células muy virulentas y eliminar aquellas con una capacidad patogénica disminuida.³

Sin embargo, dada la alta variabilidad nutricional de los diferentes lotes de suero y como consecuencia, la inconsistencia en el crecimiento del microorganismo, el medio de conservación tradicionalmente empleado no garantiza una adecuada estabilidad de la viabilidad de las cepas vacunales. Asimismo, los frecuentes pases por animal requeridos para el mantenimiento de la virulencia resultan en ocasiones inapropiados por razones logísticas, bioéticas o de seguridad del personal. En tal sentido, la introducción de un

¹ Licenciado en Microbiología.

² Maestro en Microbiología.

³ Maestro en Microbiología.

⁴ Ingeniera Química.

⁵ Técnico Medio en Medicina Veterinaria.

método de conservación de *Leptospira* que garantice una duradera y reproducible estabilidad en la viabilidad y virulencia del microorganismo, permitirá incrementar la consistencia entre procesos productivos, disminuir los costos de producción/investigación y minimizar riesgos para el personal.

La criopreservación con glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) como agentes crioprotectores, ha ofrecido excelentes resultados en la preservación de la viabilidad y virulencia de este microorganismo y es en la actualidad un método tradicionalmente empleado para la conservación de cepas al nivel internacional.⁴⁻⁷ El presente trabajo se enmarca dentro de los estudios encaminados a evaluar la criopreservación, como método de conservación de las cepas vacunales de *Leptospira* incluidas en la vacuna antileptospirosis cubana.

MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron en el estudio las cepas vacunales 87, 169 y 108 de *Leptospira interrogans*, pertenecientes a los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok, respectivamente, las cuales fueron originalmente aisladas a partir de material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana y donadas al Instituto Finlay. Desde su aislamiento las cepas fueron conservadas en medio semisólido de Fletcher.³ La virulencia fue mantenida a través de pases periódicos en hámster según los métodos descritos.³

CULTIVO PARA LOS ESTUDIOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Las cepas fueron cultivadas en medio proteico EMJH³ durante 7 d bajo condiciones de cultivo agitado (130 rpm, 30 °C). Se evaluaron características culturales como motilidad y uniformidad celular mediante observación directa bajo el microscopio de campo oscuro y pureza mediante tinción de Gram y siembra en caldo

triptona soya y caldo tioglicolato. Los cultivos puros con buena motilidad y uniformidad celular fueron considerados apropiados para los estudios de criopreservación.

CRIOPROTECTORES Y PROCEDIMIENTO DE CRIOPRESERVACIÓN

Se evaluó la capacidad crioprotectora de diferentes concentraciones de glicerol (MERCK), DMSO (BDH) y leche descremada (MERCK), así como de una mezcla de leche descremada y glicerol. Cultivos de las tres cepas de *Leptospira* fueron mezclados separadamente con glicerol o DMSO estériles hasta una concentración final de 2,5, 5 y 10 % de cada crioprotector, con leche descremada estéril hasta una concentración final de 5 y 10 % y con una mezcla de leche y glicerol (5 %:10 %). Las mezclas de cultivo y crioprotector fueron alicuotadas en volúmenes de 1 mL empleando criotubos (Nalgene) de 2 mL de capacidad con tapa de rosca, convenientemente rotuladas y congeladas a -70 °C. Todo el procedimiento anterior fue realizado en un tiempo máximo de 30 min.

ESTABILIDAD DE LA VIABILIDAD

La viabilidad de cada cepa conservada con cada variante de crioprotector fue evaluada tras 24 h, 1, 3, 5 y 7 meses de conservación. De cada variante cepa/crioprotector 3 criotubos fueron descongelados rápidamente empleando baño de agua a 37 °C y el contenido total de cada uno fue inoculado individualmente en 6 mL de medio EMJH. Tras 7 d de incubación a 30 °C bajo condiciones estáticas se determinó la concentración celular de cada cultivo mediante conteo en cámara de Petroff-Hausser y se evaluaron características culturales como motilidad y uniformidad celular, por observación directa bajo el microscopio de campo oscuro. En cada evaluación se incluyó como control de crecimiento un cultivo en medio EMJH de cada cepa no criopreservada.

ESTABILIDAD DE LA VIRULENCIA

Previo a la congelación fue determinada la dosis letal media (DL_{50}) de cada cepa en hámsters según la metodología propuesta por Fajardo y otros.⁸ Tras cada descongelación y ulterior cultivo en medio EMJH se evaluó además la estabilidad de la virulencia mediante el procedimiento descrito a continuación. Grupos de 5 animales de 45-50 g de peso fueron inoculados por vía intraperitoneal con dosis equivalentes a 100 y 1 000 veces el valor de DL_{50} mostrado por la cepa antes de la congelación. Los animales así inoculados fueron observados durante 14 d posinoculación, registrando los niveles de supervivencia y mortalidad en cada caso.

ESTABILIDAD DE LA ANTIGENICIDAD

Fue evaluada la antigenicidad de cada cepa, antes y después de cada descongelación, mediante la técnica de aglutinación microscópica (MAT)⁹ frente a antisueros policlonales de referencia específicos a cada serovar.

RESULTADOS

ESTABILIDAD DE LA VIABILIDAD

El uso de los agentes crioprotectores evaluados permitió mantener la viabilidad de las cepas vacunales de leptospira en el tiempo con diferentes grados de eficiencia. De forma general los agentes crioprotectores que permitieron una completa

estabilidad de la viabilidad de las 3 cepas fueron el DMSO 2,5 y 5 % y la leche descremada 5 % (figs. 1-3), aunque la motilidad de los cultivos en todos los casos fue visiblemente superior con el empleo de DMSO. El glicerol 10 %, la leche descremada 10 % y la mezcla de leche y glicerol (5 %:10 %) no permitieron mantener estable la viabilidad de ninguna de las 3 cepas en el período evaluado, mientras el glicerol 2,5 y glicerol 5 % tuvieron un efecto variable en los diferentes serovares.

Los rendimientos celulares alcanzados por la cepa vacunal del serovar Canicola, tras 7 d de incubación en medio EMJH luego de la descongelación, evidenciaron que para esta cepa no existieron diferencias apreciables en la estabilidad de la viabilidad con el empleo de glicerol 2,5 %, DMSO entre 2,5 y 10 % o leche descremada 5 % (fig. 1). El glicerol 5 % permitió mantener la viabilidad durante el período evaluado, aunque el grado de recuperación disminuyó apreciablemente a partir del quinto mes.

Ninguna de las concentraciones de glicerol ensayadas permitió mantener estable la viabilidad de la cepa vacunal del serovar Copenhageni durante todo el período evaluado (fig. 2). Una apreciable disminución en la recuperación de la cepa se apreció también con el empleo de DMSO 10 %; sin embargo, el DMSO 2,5 y 5 % y la leche descremada 5 % evidenciaron excelentes resultados como crioprotectores para este serovar.

La cepa vacunal del serovar Mozdok evidenció altos grados de recuperación con cualquiera de las concentraciones de DMSO ensayadas, leche descremada 5 % o glicerol 2,5 %. Por encima de 2,5 % el glicerol fue ineficiente como crioprotector tras 7 meses de evaluación (fig. 3).

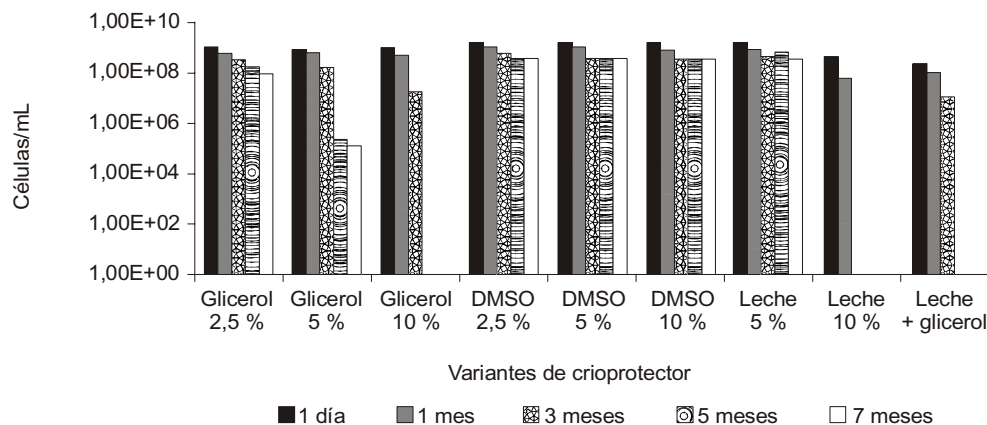


Fig. 1. Viabilidad de la cepa vacunal del serovar Canicola.

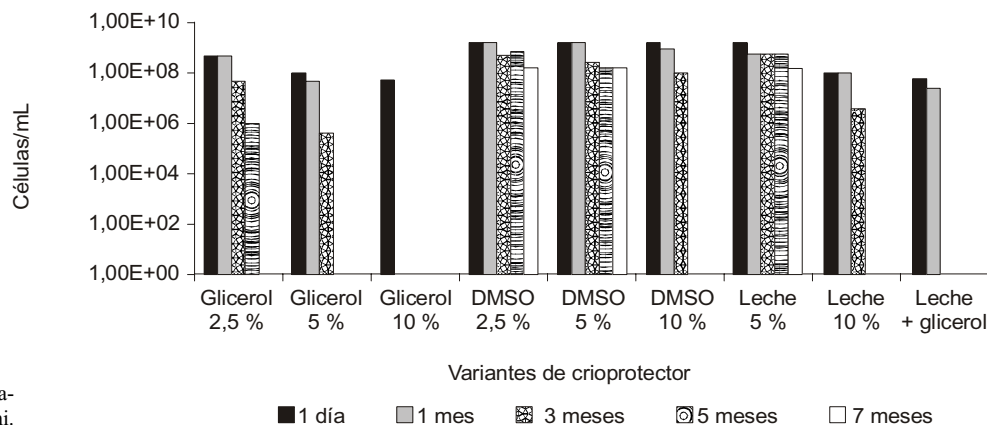


Fig. 2. Viabilidad de la cepa vacunal del serovar Copenhageni.

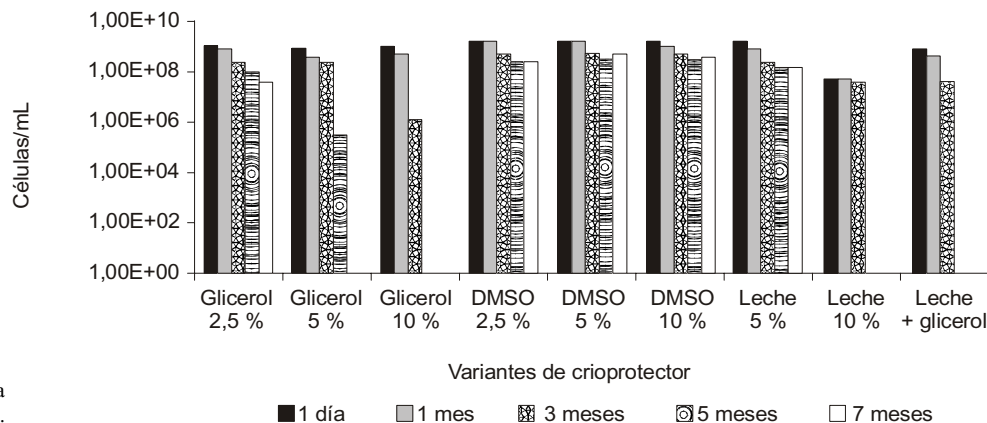


Fig. 3. Viabilidad de la cepa vacunal del serovar Mozdok.

ESTABILIDAD DE LA VIRULENCIA

Ninguno de los procedimientos de criopreservación ensayados condujo a una disminución cuantitativa de la capacidad de las 3 cepas vacunales de *Leptospira* de producir infección letal en hámsters. Tras cada descongelación todos los cultivos recuperados exitosamente e inoculados en animales con dosis equivalentes al valor de 100 y 1 000 DL50 de cada cepa previo a la congelación produjeron la muerte por leptospirosis en la totalidad de los animales, sin variación aparente en el tiempo de aparición de los síntomas.

ESTABILIDAD DE LA ANTIGENICIDAD

Al comparar la antigenicidad de las cepas mediante MAT antes y después de cada descongelación no se apreciaron diferencias en la

capacidad de reaccionar con los respectivos antisueros policlonales homólogos. Durante todo el período de conservación evaluado las 3 cepas mantuvieron títulos MAT homólogos idénticos a aquellos mostrados antes de la congelación.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de la conservación de cultivos microbianos es mantener al microorganismo vivo, no contaminado y sin variación o mutación, en una condición lo más cercana posible al aislamiento original. La criopreservación o conservación a bajas o ultrabajas temperaturas permite detener los procesos metabólicos y el deterioro biológico durante largos períodos, manteniendo la estabilidad genética del material criopreservado. Con este método resulta muy importante el empleo de crioprotectores, grupo

heterogéneo de sustancias de alta afinidad por el agua que contribuyen a la supervivencia de la célula durante la criopreservación. Los crioprotectores disminuyen el punto de congelación del sistema y reducen la cantidad y el tamaño de los cristales de hielo durante el enfriamiento, contribuyendo a la protección física de las membranas y disminuyendo el incremento de la concentración iónica producto de la congelación del agua.¹⁰

Varios estudios avalan el empleo de la criopreservación como método eficaz para el mantenimiento de la viabilidad y virulencia de cepas de *Leptospira interrogans* por períodos prolongados.⁴⁻⁷

Aunque la mayoría de los daños a las células criopreservadas suelen ocurrir durante las etapas de congelación y descongelación, resulta necesario tener en cuenta el posible efecto citotóxico de los crioprotectores sobre el microorganismo, sobre todo a concentraciones elevadas donde un anhelado incremento del efecto crioprotector resulte superado por un letal efecto tóxico sobre la célula criopreservada. Ha sido estudiada con anterioridad la citotoxicidad del glicerol y el DMSO para varios serovares de *Leptospira interrogans*.^{4,5} Algunos de estos estudios demostraron que por encima de 10 % cualquiera de los 2 crioprotectores manifiesta determinado grado de citotoxicidad, con un efecto variable en dependencia del serovar incluido en el estudio. De cualquier forma el glicerol ha mostrado 10 veces mayor capacidad citotóxica para *Leptospira* que el DMSO.⁵ Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren igualmente una mayor toxicidad del glicerol en comparación con el DMSO o la leche descremada, aunque ninguno de los crioprotectores a las concentraciones ensayadas evidenció un efecto citotóxico apreciable a corto plazo sobre cualquiera de las 3 cepas vacunales de *Leptospira*, según los resultados de las evaluaciones tras 24 h de congelación. En todos los casos la sola presencia del agente crioprotector en el medio de cultivo no influyó negativamente en los rendimientos celulares obtenidos.

La incrementada fragilidad de las células de *Leptospira* después de la congelación y descongelación, unido a la desventaja práctica de un lento crecimiento que dificulta la obtención de colonias tras el subcultivo en medio sólido,

determinan que el crioprotector incorporado no pueda ser eliminado tras el proceso de criopreservación. En tal sentido podría resultar inconveniente la inclusión de leche descremada como agente crioprotector en ceparios de *Leptospira* destinados a la producción de vacunas para uso humano, dado su origen bovino y la posibilidad de su presencia en trazas en el producto final, lo cual pudiera inducir un incremento de la reactogenicidad de la vacuna. No obstante, los resultados obtenidos avalan el empleo de este crioprotector en ceparios vacunales destinados a la investigación o a ensayos de potencia de lotes vacunales. El DMSO, en cambio, está permitido en trazas de hasta 50 mg en productos biofarmacéuticos para uso humano, al ser un solvente orgánico de origen vegetal con baja toxicidad.¹¹

Como resultado del presente estudio se logró comprobar que la criopreservación a -70 °C con el uso de un apropiado agente crioprotector permite mantener estables la viabilidad, virulencia y antigenicidad de las 3 cepas vacunales de *Leptospira* durante al menos 7 meses de conservación. Estudios adicionales deberán comprobar la estabilidad de estas propiedades por un mayor período de tiempo bajo las mismas condiciones evaluadas, así como la factibilidad del empleo de temperaturas inferiores como la congelación en nitrógeno líquido.

Preservation of vaccine strains of *Leptospira* at -70 °C

SUMMARY

The goal of this study was to evaluate the cryopreservation at -70°C with the use of 9 different cryoprotectants as a preservation method for the strains of *Leptospira interrogans* used as antigens in the leptospiral vaccine vax-SPIRAL®. Viability was systematically evaluated according to the cell yield achieved by the just thawed strains in EMJH medium. Virulence stability was estimated in Hamsters and antigenicity was evaluated by microscopic agglutination test using reference antisera before and after cryopreservation. Only the use of 2,5% and 5% dimethyl sulfoxide or 5% skim milk allowed a quick recovery of the three strains without virulence or antigenicity depletions after 7 months of cryopreservation while glycerol had a variable effect on the degree of recovery of each strain. The results showed the feasibility of the cryopreservation at -70 °C with the use of a suitable cryoprotectant as a preservation method for vaccine strains of *Leptospira*.

Key words: *Leptospira interrogans*, vaccinal strains, cryopreservation.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, et al. Vacuna antileptospirósica trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de la reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. *VacchiMonitor* 1997;6(12):2-10.
2. Bernasovskaia EP, Kondratenko VN, Melnitskaia EV. The connection of the antigenic activity of *Leptospira* to its virulence. *Mikrobiol Z* 1994;56(6):46-50.
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MedSci; 1999.
4. Reed NE, Varney WC, Goddard RD, Wyeth PJ. The maintenance of challenge strains used in the potency test for canine *Leptospira* vaccines. *Biologicals* 2000;28:25-8.
5. Palit A, Haylock LM, Cox JC. Storage of pathogenic leptospires in liquid nitrogen. *J Appl Bacteriol* 1986;61:407-11.
6. Alexander A, Lessel E, Evans L, Frank E, Green S. Preservation of leptospires by liquid-nitrogen refrigeration. *Int J Syst Bacteriol* 1972;22:165-9.
7. Stalhein O. Viable, avirulent *Leptospira interrogans* serotype pomona vaccine: Preservation in liquid nitrogen. *Appl Microbiol* 1971;22:726-7.
8. Fajardo ME, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, et al. Normalización de la dosis letal 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna antileptospirósica cubana para uso humano. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50:22-6.
9. Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 1973;5:65-9.
10. Gherna R. Preservation. En: Gerhardt P. *Manual of Methods for General Bacteriology*. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1981. p.208-17.
11. ICH Steering Committee. Guideline for residual solvents in pharmaceuticals for human use. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humans Use. *FDA Federal Register* 1997;62(247):673-77.

Recibido: 9 de septiembre de 2005. Aprobado: 8 de febrero de 2006.
 Lic. *Reinier Borrero Maura*. Instituto "Finlay". Ave. 27 No. 19805, municipio La Lisa. AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 208 6075; Teléf.: (53-7) 202 0986. Correo electrónico: andresglez@finlay.edu.cu