

EL PAPER

Método para revitalizar las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en los ensayos de potencia de la vacuna antileptospirósica

Instituto Finlay, Ave. 27 No. 19805, La Lisa, La Habana, Cuba, Apartado Postal 16017, Código Postal 11600, Tel. 21-4635, Fax. 53(7) 33 6075, e-mail: yhernandez@finlay.edu.cu

Autores:

Yaumara Hernández González, Técnico de Nivel Medio en Procesos Biológicos.

Esther María Fajardo Díaz, Investigadora Auxiliar, Licenciada en Ciencias Biológicas.

Bernardo Ortiz Matos, Licenciado en Microbiología, Especialista en Control de Medicamentos.

Resumen

Las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en los ensayos de potencia de las vacunas antileptospirósicas requieren una adecuada virulencia (alta letalidad), que demuestre la diferencia entre los animales vacunados y los controles después del reto; con este fin los lotes semillas de trabajo se conservan en nuestro laboratorio en Medio de Cultivo Fletcher. Después de introducir el ensayo en la práctica diaria, se ha observado que la virulencia decae antes del tiempo establecido en estudios anteriores, apuntando al método de revitalización de estas conservaciones como la posible causa de esta situación.

En el presente trabajo se compara el método reportado para la exacerbación de la virulencia de *Leptospira interrogans*, basado en inoculaciones ó pases sucesivos por hámsters de suspensiones de hígado de animales moribundos y una variante propuesta, consistente en ajustar previamente los inóculos para que contengan de 10 a 12 leptospiras por campo (observación realizada en campo oscuro y con aumento de 400x).

El método propuesto permite la correcta revitalización de las cepas estudiadas (serovares *pomona mozdok e icterohaemorrhagiae copenhageni*) para que cumplan los requisitos de calidad y puedan ser utilizadas en el ensayo de potencia de la vacuna cubana para uso humano (vax-spiral): provocar la muerte de los animales controles al cabo de 5 días de la inoculación en el caso de *pomona* y de 5 a 7 días para *icterohaemorrhagiae*.

Introducción

Las cepas de los serogrupos de *Leptospira interrogans* usadas en los ensayos de potencia de las vacunas antileptospirósicas requieren una adecuada virulencia, expresada en forma de alta letalidad, que permita demostrar la diferencia existente entre los animales vacunados (sobreviven) y los animales controles (mueren) después del reto. Con este fin se conservan de manera apropiada, para que mantengan estas características.

En nuestro laboratorio se trabaja con los serogrupos *canicola*, *icterohaemorrhagiae* y *pomona*, los cuales se conservan en medio Fletcher. De acuerdo con estudios realizados, las conservaciones de *pomona* mantienen su virulencia durante 6 meses, y hasta 3 en los casos de *icterohaemorrhagiae* y *canicola*. Para mantener estas cepas en condiciones óptimas, se revitalizan mediante pases por hámsters. Como criterio de calidad se consideran útiles cuando una suspensión de ellas que contenga de 10 a 12 leptospiras por campo (400x y campo oscuro) se inocule en un volumen de 0,5 mL por vía intraperitoneal en hámsters de 60 a 90 g de peso y provoque la muerte de éstos alrededor del quinto día para *pomona* y *canicola* y al séptimo día para *icterohaemorrhagiae*. Sin embargo, hemos observado que en el desempeño rutinario del ensayo de potencia, las cepas no siempre provocan la muerte en los tiempos establecidos ni con la letalidad deseada. Un análisis de la situación indicó que el origen de estos problemas podría radicar en la manera de revitalizar las conservaciones de estos serogrupos. El objetivo del presente trabajo fue perfeccionar el método de revitalización de las cepas de *L. interrogans* con vistas a lograr que éstas cumplieran con los requisitos de calidad exigidos en el ensayo de potencia de la vacuna antileptospirósica cubana (vax-spiral) trabajando sobre la base del ajuste de los inóculos a utilizar.

Materiales y Métodos

Cepas de *Leptospira interrogans*. Se usaron las cepas *pomona mozdok* (No. 108) e *icterohaemorrhagiae copenhageni* (No. 169) suministradas gentilmente por los laboratorios de producción de la vacuna veterinaria

(LABIOFAM, Cuba), conservadas en Medio Fletcher. Estas cepas fueron aisladas en Cuba, en los años 1988 y 1993 respectivamente, por el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de Arroyo Arenas, en La Habana. Se identificaron con sus respectivos sueros homólogos de Referencia Internacionales mediante el ensayo de microaglutinación. Se conservaron en nuestro laboratorio en Medio Fletcher por espacio de 7 meses y se revitalizaron con 2 pases por animales para el caso de *pomona* y con 6 pases para *icterohaemorrhagiae* usando el método.

Medios de Cultivo y Soluciones. Medio Fletcher (MF) para conservar las cepas; Medio EMJH para realizar aislamientos de hígado, pases de cepas y diluciones de los cultivos; solución de formaldehído al 10 % tamponada con fosfatos (PBS) para inactivar los microorganismos (FT).

Animales. Hámsters (*Mesocricetus auratus*), variedad sirio dorado, de 60 a 90 g, mismo sexo, suministrados por CENPALAB, Cuba.

Métodos para revitalizar las cepas

Método clásico. A partir de la conservación en MF, se realizó una siembra de 500 mL en 10 mL de medio EMJH, de modo que el inóculo fuese el 5 % del total del volumen. Después de 7 días de incubación a 28 °C se observó el crecimiento del microorganismo. Sólo se usaron suspensiones con densidades de crecimiento altas, o sea, con turbidez apreciable, corroborada por observación de frotis que denotaron abundantes leptospiras y se inocularon 0,5 mL del cultivo seleccionado en cada uno de 6 hámsters, por vía intraperitoneal, los cuales se mantuvieron en observación a partir de ese momento. De los animales con síntomas característicos de la enfermedad se extrajo el hígado en condiciones asépticas, se maceró y resuspendió en medio EMJH. Este macerado se inoculó en nuevos animales de la misma manera y se continuaron los pases hasta que se logró que el período de aparición de los síntomas no sobrepasara los cinco días. Una vez obtenida esta condición se consideró que la cepa se había revitalizado y se procedió a la preparación de las conservaciones de trabajo según metodología descrita.

Método propuesto. Se diferenció del anterior en que todas las suspensiones que se inocularon a los animales se ajustaron previamente a una concentración equivalente a 10 – 12 leptospiras por campo, denominada dilución de ajuste. Este conteo se realizó mediante microscopía de campo oscuro con un aumento total de 400x y para el mismo se realizaron diluciones 1:10, 1:20 y 1:40 a partir del cultivo o de la suspensión de hígado, las cuales se inactivaron durante 10 minutos con FT a razón de 5 % de concentración final. Una muestra de 5 mL de cada una de estas diluciones respectivamente, se aplicó sobre una lámina portaobjetos, se le colocó un cubreobjetos, se observaron 20 campos y se contó el número de gérmenes en cada uno. A continuación se calculó la media aritmética para cada dilución, se consideró satisfactoria aquella donde se obtuvieron 10 a 12 leptospiras por campo. Del cultivo o del macerado de hígado se preparó una dilución equivalente a la que presentó el número de leptospiras señalado y se inocularon 0,5 mL a cada uno de 6 hámsters de 60 a 90 g de peso, por vía intraperitoneal.

Determinación de la concentración celular. Se realizó mediante conteo en cámara de Petroff- Hausser (Hausser Scientific Company, USA), en microscopio con condensador de campo oscuro, con aumento de 400x. Teniendo en cuenta el valor de la dilución de ajuste, se preparó una dilución a partir de ésta equivalente a diluir 100 veces el cultivo puro y se evaluó el número de leptospiras por mililitro presentes en el cultivo puro y en la dilución de ajuste preparada a partir de éste, para conocer el número de leptospiras que recibieron los animales en cada dosis inoculada. Y poder establecer la comparación entre la concentración celular del macerado puro y del macerado ajustado.

El conteo se realizó en los dieciséis cuadros de la periferia de la cámara, siguiendo instrucciones del fabricante; las lecturas se llevaron a cabo por duplicado y se trabajó con la media aritmética (\bar{x}); la fórmula aplicada para determinar la concentración del cultivo fue:

Concentración del cultivo = (\bar{x} . 20 . 10⁶ . Dilución de conteo) / No. de cuadros contados

Donde: \bar{x} : Media aritmética calculada; 20 . 10⁶: constante dada por la profundidad, área y volumen de la cámara;

Dilución de conteo: dilución del cultivo utilizada para el conteo; No. de cuadros contados: 16*16 = 256

Resultados y discusión

En el presente trabajo se estudiaron conservaciones de los serogrupos *pomona* e *icterohaemorrhagiae* obtenidas por el método clásico de revitalización de las cepas, en comparación con una nueva variante propuesta, consistente en ajustar las concentraciones de todos los inóculos usados, siguiendo el método descrito para la normalización de la dosis letal 50 % de estos serogrupos, con el objetivo de obtener conservaciones que cumplieran con los requisitos de calidad establecidos para ser utilizadas en el ensayo de potencia de la vacuna antileptospirosis trivalente cubana

(vax-spiral). Se observa que cuando se utiliza el inóculo no ajustado (método clásico), el intervalo de tiempo en que ocurre la muerte de los animales después de la inoculación disminuye rápidamente en la medida que aumenta el número de pases. Teniendo en cuenta que para considerar útil la cepa de reto para el ensayo de potencia los animales deben morir al quinto día a partir de la inoculación, hubiese sido suficiente un solo pase para considerar revitalizada la cepa en ambos serogrupos por el método clásico. Sin embargo, al utilizar el inóculo ajustado (método propuesto), se observó que el primer pase no fue suficiente para obtener mortalidad al quinto día. En el caso de *pomona*, los animales murieron al octavo día después de la primera inoculación y sólo después de 4 pases sucesivos fue que se obtuvo mortalidad al quinto día. Se dio un pase extra para garantizar que la virulencia fuese óptima, con el cual se logró la muerte al cuarto día. Con el serogrupo *icterohaemorrhagiae* se observó un comportamiento semejante. Después de la primera inoculación, los animales murieron al noveno día y fueron necesarios 5 pases sucesivos para obtener mortalidad al quinto día y considerar la cepa revitalizada. Esto resalta la importancia de introducir el ajuste de los macerados usados como inóculos en los pases sucesivos para garantizar la correcta revitalización de las cepas de *L. interrogans*. El método propuesto demuestra realmente la recuperación paulatina de la virulencia en la medida que se incrementa el número de pases por animales, lo cual no ocurre con el método clásico, que desde los primeros pases muestra valores de mortalidad que sugieren buena virulencia, cuando en realidad no es así.

Con relación a la concentración bacteriana presente en los inóculos, las tablas 1 y 2 (ver página 10) muestran que en los casos del cultivo no ajustado (método clásico), las concentraciones por dosis que reciben los animales son muy altas, de modo que justifican la muerte en un período de tiempo más corto que en el caso del cultivo ajustado (método propuesto), no dando tiempo a los microorganismos altamente virulentos a que proliferen adecuadamente y predominen en la población. La muerte en corto tiempo de los animales en el caso del cultivo no ajustado podría tener como causa principal la carga de lipopolisacáridos recibida al ser inoculados con tan alta concentración bacteriana, ya que se les describe como responsables de varios de los síntomas de la enfermedad. En el caso del cultivo ajustado, como las concentraciones son menores, los microorganismos altamente virulentos tienen tiempo de seleccionarse y poder multiplicarse; en cada pase este proceso de selección se repite con más fuerza, de modo que después de varios pases sucesivos la población microbiana obtenida consiste prácticamente en su totalidad de leptospiras altamente virulentas, que cumplen con los requisitos de calidad del ensayo de potencia. Todo lo antes expuesto demuestra que el método propuesto para la revitalización de las cepas de *Leptospira interrogans* necesarias para el ensayo de potencia de la vacuna antileptospirosis vax-spiral es superior al método clásico descrito en la literatura. Su introducción en la práctica en nuestro laboratorio ha mostrado muy buenos resultados en lo que respecta al cumplimiento de los requisitos de calidad de las cepas de reto, por lo cual se recomienda para estos fines en vacunas equivalentes para uso humano y veterinario.

Serogrupo *Pomona*

Concentración de lep/dosis (0.5 ml)			
Macerado	Cultivo no ajustado	Cultivo ajustado	Diferencia cultivos
1	183.5 x 10 ⁶	70.3 x 10 ⁶	113.2 x 10 ⁶
2	222.6 x 10 ⁶	50.78 x 10 ⁶	171.82 x 10 ⁶
3	238.2 x 10 ⁶	44.92 x 10 ⁶	193.28 x 10 ⁶
4	224.6 x 10 ⁶	64.45 x 10 ⁶	160.15 x 10 ⁶
5	244.1 x 10 ⁶	64.45 x 10 ⁶	179.65 x 10 ⁶

Tabla 1. Serogrupo *pomona*: comparación entre el método clásico (inóculo no ajustado) y el propuesto (inóculo ajustado), en lo que respecta a las concentraciones de leptospiras que reciben los animales en la dosis inoculada (0.5 ml).

Serogrupo *Icterohaemorrhagiae*

Concentración de lep/dosis (0.5 ml)			
Macerado	Cultivo no ajustado	Cultivo ajustado	Diferencia cultivos
1	242.1 x 10 ⁶	64.45 x 10 ⁶	177.65 x 10 ⁶
2	228.5 x 10 ⁶	136.7 x 10 ⁶	91.8 x 10 ⁶
3	197.2 x 10 ⁶	109.3 x 10 ⁶	87.9 x 10 ⁶
4	238.2 x 10 ⁶	21.48 x 10 ⁶	216.72 x 10 ⁶
5	236.3 x 10 ⁶	42.96 x 10 ⁶	193.34 x 10 ⁶

Tabla 2. Serogrupo *icterohaemorrhagiae*: comparación entre el método clásico (inóculo no ajustado) y el propuesto (inóculo ajustado), en lo que respecta a las concentraciones de leptospiras que reciben los animales en la dosis inoculada (0.5 ml).

Material complementario

N. de la R.: Los autores enviaron a nuestra redacción dos gráficos comparativos entre el método clásico (inóculo no ajustado) y el propuesto (inóculo ajustado), en lo que respecta al tiempo de muerte en los pases sucesivos realizados para revitalizar la cepa de reto de los serogrupos *pomona* y *icterohaemorrhagiae*. Aquellos interesados en el citado material, confeccionado con la colaboración del Ingeniero Informático Karel Alvarez del Instituto Finlay, pueden contactarse al e-mail de referencia: yhernandez@finlay.edu.cu

Referencias

- Fletcher, W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1928; 21: 265-87.
- Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, Labrador I, Álvarez E, Método para normalizar la dosis letal 50 % (DL₅₀) de *Leptospira interrogans*. *Rev. Cub Med. Trop.* 1998; 50 (1): 22-6.
- Information on *Leptospira* Vaccine-KGCC. Korea Green Cross Corporation, 1994.
- Faine S, ed. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization, 1982; 83 (WHO offset publication no. 67)
- Biological Substances: International Standards and Reference Reagents. Geneva: World Health Organization, 1990: 78-80.
- Faine S, ed. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization, 1982; 76, 115-116 (WHO offset publication no.67)
- Ellinghausen, H.C, McCullough, W.G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Amer J Vet Res* 1965; 26: 45-51.
- Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Zbe Backt* 1990; 273: 200-208.