

INSTITUTO "FINLAY"

Normalización de la dosis letal 50 % de cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna antileptospirósica cubana para uso humano

Lic. Esther María Fajardo,¹ Lic. Bernardo Ortiz,² Dra. Adelina Chávez,³ Dra. Noemí Gaínza,⁴ Lic. Luis Izquierdo,⁵ Téc. Yaumara Hernández,⁶ Téc. Iyalili Labrador⁶ y Téc. Eduardo Álvarez⁷

RESUMEN

Se normalizó la DL₅₀ de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el ensayo de potencia de la vacuna antileptospirósica trivalente cubana para uso humano. Se introdujo en la metodología el control del contenido de leptospiras de los cultivos mediante dilución de ajuste (10 a 12 leptospiras por campo). Ésta fue la clave de la normalización del ensayo, por garantizar la reproducibilidad del valor estimado de DL₅₀ de cada serogrupo: 10^{5.98} para *canicola*, 10^{5.60} para *icterohaemorrhagiae* y 10^{6.49} para *pomona*, con límites de 1 log₁₀ de 10^{4.98} - 10^{6.9}; 10^{4.60} - 10^{6.60} y 10^{5.49} - 10^{7.49} respectivamente, y para un intervalo de confianza de 95 % (± 2 DE) fueron 10^{5.54} - 10^{6.19}; 10^{5.33} - 10^{5.75} y 10^{6.35} - 10^{6.60} respectivamente, que son inferiores a los anteriores, lo que implica aún mayor reproducibilidad. La metodología descrita fue satisfactoria en la normalización de la DL₅₀ de las cepas de reto y podría ser utilizada también en la evaluación de la virulencia de otras cepas de *L.interrogans*, incluidas las de producción de la vacuna.

Descriptor DeCs: DOSIFICACION LETAL MEDIANA; LEPTOSPIRA INTERROGANS/inmunología; LEPTOSPIRA INTERROGANS/aislamiento & purificación; VACUNAS BACTERIANAS; CUBA.

La leptospirosis es una enfermedad de amplia difusión en todo el mundo. Su agente causal es *Leptospira interrogans*, se reportan más de 50 especies animales que sirven de reservorio a este microorganismo (roedores, insectívoros, carnívoros, primates, ranas, serpientes, lagartos, peces, etcétera), por lo que se encuentra en constante circulación en el entorno natural e infecta a los animales domésticos y al hombre. Desde el punto de vista epidemiológico la leptospirosis se considera una zoonosis. El agua contaminada es uno de los factores que más contribuyen a su diseminación.^{1,2}

Las medidas de prevención son múltiples y entre ellas se destacan el control de roedores, la hie-

ne ambiente, y la vacunación de animales y personas con alto riesgo de padecer la leptospirosis.²⁻⁵

Las vacunas utilizadas para estos fines se controlan en el laboratorio durante su proceso de producción mediante diferentes ensayos. Uno de ellos es el de potencia, el cual mide la protección que confiere el producto a animales inmunizados que reciben una dosis conocida de leptospiras virulentas, la cual se expresa cuantitativamente y su unidad de medida es la dosis letal 50 % (DL₅₀). Este término es muy utilizado para expresar la magnitud de la virulencia de microorganismos (virus, bacterias) y la toxicidad de sustancias sintetizadas por éstos. Se define en general como la menor cantidad de gér-

¹ Licenciada en Ciencias Biológicas. Investigadora Agregada. Instituto "Finlay".

² Licenciado en Microbiología. Especialista en Control de Medicamentos. Instituto "Finlay".

³ Médico Veterinario. Especialista en Producción de Vacunas Veterinarias. LABIOFAM.

⁴ Médico Veterinario. Especialista en Control de Medicamentos. Instituto "Finlay".

⁵ Licenciado en Matemáticas. Investigador Agregado. Instituto "Finlay".

⁶ Técnico Medio en Procesos Biológicos. Instituto "Finlay".

⁷ Técnico Medio en Farmacia Industrial. Instituto "Finlay".

menes virulentos o de toxina que al administrarse por la vía apropiada a un número de animales susceptibles, provoca la muerte de la mitad de éstos (50 %) al término de un período dado.

En la producción de vacunas, las dosis de reto o de confrontación de los animales inmunizados correspondientes al ensayo de potencia se refieren siempre en términos de DL_{50} .^{6,10} Ésta a su vez se puede expresar de diferentes maneras: como gérmenes por dosis, títulos, dilución, unidades arbitrarias, unidades de masa o volumen (en el caso de toxinas), etcétera.

En relación con la vacuna antileptosirósica, las cepas usadas en la producción deben mantener altos niveles de virulencia para lograr un preparado de calidad; este parámetro se controla mediante la evaluación de la DL_{50} , al igual que en las cepas destinadas al ensayo de potencia, donde se necesita además que el valor estimado sea reproducible para garantizar dosis de confrontación que contengan de 10 a 10 000 DL_{50} , como se especifica en algunos documentos regulatorios.^{9,10}

La DL_{50} de *L. interrogans*, al igual que para otras bacterias y virus, se determina mediante un ensayo biológico consistente en inocular diluciones seriadas (generalmente con factor igual a 10) preparadas a partir de una suspensión virulenta del microorganismo, las cuales se inoculan en hámsters u otros animales de laboratorio que sean susceptibles. Este ensayo es muy específico, pero está sometido a grandes variaciones debidas sobre todo a la naturaleza biológica de sus componentes fundamentales: animales y microorganismos.

Por estas 2 razones es muy importante, cuando se define la DL_{50} de un germen determinado, fijar todos los parámetros posibles bajo los cuales se desarrolla satisfactoriamente el ensayo, para que los valores calculados sean reproducibles y, por tanto, útiles para los fines a los que están destinados. El primer parámetro que se debe controlar es la conservación de la virulencia de las cepas. La liofilización es una forma muy usada para estos fines, sobre todo si se trata de microorganismos que intervienen en la producción y el control de vacunas por sus múltiples ventajas, entre ellas, la facilidad de almacenamiento a largo plazo en condiciones normales de refrigeración (2 a 8 °C) y la garantía de la integridad de las cepas al utilizar el sistema de lotes semilla recomendado por la Organización

Mundial de la Salud (OMS),¹¹ que implica reproducibilidad en los procesos y ensayos donde sean utilizadas las cepas.

L. interrogans pierde con facilidad su virulencia cuando se somete a pases repetidos por medios de cultivo; la liofilización no ha sido la forma más exitosa para su conservación,¹² lo cual limita la posibilidad de aplicar correctamente el sistema de lotes semilla. El mantenimiento en nitrógeno líquido ha mostrado ser apropiado,¹³ pero resulta costoso y limitado. El uso de medios semisólidos es frecuente, aunque tiene el inconveniente de que no conserva la virulencia por largo tiempo; algunas publicaciones refieren que *L. interrogans* se mantiene virulenta mediante pases por animales susceptibles,^{3,14} y en el caso específico de las cepas de confrontación, el día del ensayo se recuperan los gérmenes de macerados de hígado de animales moribundos con los que se preparan las suspensiones para retar a los animales inmunizados.¹⁴ Este método es muy laborioso y no permite un buen control del inóculo. Otras referencias no especifican cómo se deben conservar las cepas de reto virulentas.^{9,10,15}

El segundo parámetro en importancia se relaciona con el cultivo: medio, edad y condiciones en que debe mantenerse hasta el momento de ser utilizado. El tercero se refiere al ajuste de la suspensión a partir de la cual se preparan las diluciones seriadas que reciben los animales. Se reporta el uso de la cámara de Petroff-Hausser para realizar el conteo del número de leptospiras presentes en el cultivo de partida,¹⁰ en ese caso la DL_{50} se expresa en leptospiras por dosis inoculada, valor que se toma después para preparar los inóculos de reto de modo que contengan de 10 a 10 000 DL_{50} .

El cuarto parámetro se relaciona con la especie animal que se va a utilizar, la cantidad y el peso; a veces el sexo también es importante. El quinto tiene que ver con la dosis y la vía de administración del inóculo, el sexto con las condiciones en que deben mantenerse los animales y el séptimo con el tiempo de observación de éstos.

Si se procura que estas condiciones se repitan para cada ensayo, entonces la variación en los resultados será menor y mayor la reproducibilidad, por lo que se garantizará el éxito de la prueba.

En el presente trabajo se describe la metodología utilizada para normalizar la DL_{50} de las cepas de *L. interrogans* serogrupos *canicola*, *icterohaemorrhagica*

giae y *pomona* que intervienen en el ensayo de potencia de la vacuna antileptospirósica trivalente cubana (vax-SPIRAL), de acuerdo con los parámetros señalados.

MÉTODOS

Cepas de L. interrogans. Se usaron las cepas *canicola canicola* No. 87, *pomona mozdok* No. 108 e *icterohaemorrhagiae copenhageni* No. 169 de los laboratorios de producción de la vacuna veterinaria (LABIOFAM), conservadas en medio Fletcher. Estas cepas fueron aisladas en Cuba, en los años 1988, 1990 y 1993, respectivamente, por el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de Arroyo Arenas, en La Habana.

Medios de cultivo y soluciones. Medio Fletcher¹⁶ para conservar las cepas; medio EMJH¹⁷ para realizar aislamientos de hígado, pases de cepas y diluciones de los cultivos; solución de formaldehído al 10 % tamponada con fosfatos (FT) para inactivar los microorganismos.

Animales. Hámsters (*Mesocricetus auratus*) de 40 a 60 g, de igual sexo, suministrados por CENPALAB, Cuba.

Preparación del lote semilla de trabajo. Se inocularon animales con los gérmenes virulentos, que se recuperaron posteriormente, por siembra en medio EMJH, de muestras de hígado de los animales moribundos. Después de 7d de incubación a 28 °C se dio pase a tubos que contenían medio Fletcher, los cuales conformaron el lote semilla de trabajo y se mantuvieron a 28 °C.

Determinación de la DL₅₀. Seis días antes del ensayo, se transfirieron 0,5 mL de la conservación en medio Fletcher a 3 tubos con medio EMJH (a cada uno de ellos) y se incubaron a 28 °C. El día del ensayo se procedió a examinar la pureza y viabilidad de los cultivos por observación microscópica en campo oscuro y se prepararon diluciones 1:5; 1:10; 1:20 y 1:40 de éstos en medio EMJH, con un volumen máximo de 1 mL, a éstas se les adicionó respectivamente 50 µL de FT y se esperó 10 min para su inactivación. Usando microscopía de campo oscuro y aumento de 400 veces se procedió al conteo de los microorganismos en una muestra de 5 µL de la dilución correspondiente, colocados entre porta y cubreobjetos. Se observaron 20 campos y se contó

el número aproximado de leptospiras en cada uno; se calculó la media aritmética, la cual se consideró satisfactoria si daba como resultado 10 a 12 leptospiras por campo; si con ninguna de las diluciones antes mencionadas se obtenían esos valores, se realizaban los cálculos necesarios para determinar de forma teórica la dilución correcta, la cual se preparó a partir del cultivo puro, se inactivó y se sometió al conteo. La dilución que presentó 10 a 12 leptospiras por campo se denominó dilución de ajuste y se consideró apropiada para preparar una dilución equivalente a partir del cultivo puro, de volumen no inferior a 5 mL de la cual se tomó una muestra de 1 mL, se inactivó y verificó por conteo, como ya se ha descrito, que contenía de 10 a 12 leptospiras por campo. A partir de la dilución de ajuste sin inactivar se prepararon diluciones seriadas con factor de 10, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ y se usó medio EMJH como diluyente; posteriormente se inocularon 6 animales por cada dilución con 0,5 mL vía intraperitoneal y se observaron durante 14 d; se anotaron las muertes ocurridas y los animales que presentaron síntomas el último día se reportaron como muertos. Con los datos obtenidos se calculó la DL₅₀ por el método de Reed-Muench,¹⁸ y se expresó en términos del inverso del valor de la dilución donde ocurrió la muerte del 50 % de los animales inoculados, referido a la dilución de ajuste.

RESULTADOS

Se realizaron 14 determinaciones de la DL₅₀ de cada una de las cepas de reto, mediante igual metodología. El valor estimado de DL₅₀ para cada serogrupo se calculó sobre la base de la media geométrica de los valores individuales obtenidos respectivamente. En el serogrupo *icterohaemorrhagiae* se observó que cuando las conservaciones en medio Fletcher tenían más de 100 d de edad, el valor de la DL₅₀ se afectaba de forma apreciable; esto ocurrió en los 2 últimos ensayos, los cuales fueron excluidos de los cálculos. Este comportamiento no sucedió con *pomona*, que se mantuvo muy estable. La conservación de *canicola* tenía sólo 57 d de edad cuando concluyó el estudio y su comportamiento era adecuado.

En los 3 casos los animales inoculados con la dilución de ajuste murieron el quinto día posterior a la inoculación en todos los ensayos realizados.

La tabla presenta el resumen de los resultados de la determinación de la DL_{50} para cada serogrupo. Los valores estimados de la DL_{50} que aparecen en ésta se calcularon a partir de los 12 primeros ensayos realizados.

TABLA. Resumen de los resultados de los ensayos para normalizar la DL_{50} de los serogrupos de *Leptospira interrogans*

Serogrupo	Dilución de ajuste	Varianza (σ^2)	Límites	
	Media geométrica (DL_{50}/dosis)		95 % de confianza	Límites 1 \log_{10}
<i>canicola</i>	$10^{5.98}$	1,15	$10^{5.54}$ y $10^{6.19}$	$10^{4.98}$ y $10^{6.98}$
<i>icterohaemorrhagiae</i>	$10^{5.60}$	9,78	$10^{5.33}$ y $10^{5.75}$	$10^{4.60}$ y $10^{6.60}$
<i>pomona</i>	$10^{6.49}$	2,43	$10^{6.35}$ y $10^{6.60}$	$10^{5.49}$ y $10^{7.49}$

Los valores de la media geométrica de las DL_{50}/dosis referidos a la dilución de ajuste fueron $10^{5.98}$ para *canicola*, $10^{5.60}$ para *icterohaemorrhagiae* y $10^{6.49}$ para *pomona*; por lo que la virulencia de las cepas en orden decreciente fue *pomona* mayor que *canicola* y ésta a su vez mayor que *icterohaemorrhagiae*.

Los límites máximos del intervalo de la media reportados para este tipo de ensayo⁶ son de 1 \log_{10} cuando se parte siempre del mismo cultivo semilla de trabajo, por lo que para *canicola* resultaron ser $10^{4.98}$ y $10^{6.98}$, para *icterohaemorrhagiae* $10^{4.60}$ y $10^{6.60}$, y para *pomona* $10^{5.49}$ y $10^{7.49}$. Sin embargo, los límites calculados para un intervalo de confianza de 95 % ($\pm 2DE$) fueron para *canicola* $10^{5.54}$ y $10^{6.19}$, *icterohaemorrhagiae* $10^{5.33}$ y $10^{5.75}$, y para *pomona* $10^{6.35}$ y $10^{6.60}$, que son inferiores, por lo que se garantiza mayor reproducibilidad en los resultados.

Tomando como referencia la varianza (σ^2), el serogrupo que presentó mayor variación fue *icterohaemorrhagiae* ($\sigma^2 = 9,78$) y el menos variable fue *canicola* ($\sigma^2 = 1,15$). Esto concuerda con las variaciones en el crecimiento del serogrupo *icterohaemorrhagiae* en medio EMJH observadas en los diferentes ensayos, que parecen influir directamente en su virulencia. No ocurrió así con los serogrupos *canicola* y *pomona*, que presentaron patrones de crecimiento más estables.

DISCUSIÓN

El número de pruebas realizadas siguiendo siempre la misma metodología garantizó que los parámetros que influían de forma directa en los resultados estuvieran siempre bajo control y permitió normalizar el ensayo de determinación de la DL_{50} de las cepas de reto utilizadas en el control de la potencia de la vacuna antileptospirósica trivalente cubana para uso humano (vax-SPIRAL), ya que se demostró que los límites de los valores estimados de las respectivas DL_{50} para un intervalo de confianza de 95 % ($\pm 2DE$), se encontraban ampliamente dentro de los reportados para 1 \log_{10} .

El parámetro crítico fue el ajuste del cultivo, que se resolvió con la introducción de la dilución de ajuste, la cual constituyó el elemento clave en la normalización del ensayo, pues resultó ser la base de la reproducibilidad del estimado del valor de DL_{50} determinado para los serogrupos estudiados, ya que aparte del crecimiento obtenido en el cultivo puro, cada serogrupo se ajustó para cada ensayo de acuerdo con el mismo criterio, de modo que tuviera de 10 a 12 leptospiras/campo y de esta manera el inóculo de partida fue semejante cada vez que se efectuó un nuevo ensayo. Esto hizo que la metodología descrita se diferenciara de las reportadas, donde no se especifica la manera de ajustar el cultivo^{9,14,15} o se realiza por conteo de leptospiras en la cámara de Petroff-Hausser.¹⁰ Este tipo de ajuste fue llevado a cabo al principio en nuestro laboratorio, pero en experiencias previas de validación demostró mayor variación y dependencia del analista que el conteo por campos (no se presentan los datos), por lo que nos decidimos por este último. Los resultados obtenidos fueron adecuados, por lo que el conteo por campos se consideró satisfactorio para estos fines.

La muerte de los animales inoculados con la dilución de ajuste al quinto día se tomó como criterio de calidad del lote semilla de trabajo. Esta característica se logró mediante pases repetidos por animales.

Se debe seguir esta metodología para lograr resultados satisfactorios en los ensayos de potencia de la vacuna antileptospirósica cubana para uso humano (vax-SPIRAL); además, podría ser utilizada también en la evaluación de la virulencia de otras cepas de *L. interrogans* incluidas las de producción de la vacuna.

SUMMARY

The LD₅₀ of strains of *L. interrogans* used in the potency assay of the Cuban trivalent leptospiral vaccine intended for human use was standardized. The control of the leptospire content of the cultures by means of the adjusting dilution (10 to 12 leptospire per field) was introduced. That was the key of the standardization of the assay, since it guaranteed the reproducibility of the estimate of the LD₅₀ value for each serogroup: 10^{5.98} for *canicola*, 10^{5.60} for *icterohaemorrhagiae* and 10^{6.60} for *pomona*, with the following limits for an interval of 1 log₁₀: 10^{4.98} - 10^{6.98}, 10^{4.60} - 10^{6.60} and 10^{5.49} - 10^{7.49}, respectively; whereas for a 95 % (± 2 SD) confidence interval the values were: 10^{5.54} - 10^{6.19}; 10^{5.33} - 10^{5.75} and 10^{6.35} - 10^{6.60}, respectively. These values were lower than the previous ones, which means ever more reproducibility. The methodology described proved to be satisfactory for the standardization of the LD₅₀ of the challenge strains and it could also be used for evaluating the virulence of other strains of *L. interrogans*, including those used for the vaccine production.

Subject headings: LETHAL DOSE50; LEPTOSPIRA INTERROGANS/immunology; LEPTOSPIRA INTERROGANS/isolation & purification; BACTERIAL VACCINES; CUBA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ting-zuo Ch. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann Immunol Hung* 1986;26:125-51.
2. Andre-Fontaine G, Ganiere JP. New topics on leptospirosis. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1990;13(3):163-8.
3. Faine S, ed. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization, 1982;83 (WHO offset publication no. 67).
4. Reports of discussions of the WHO working group on leptospirosis vaccine development and vaccinology. Ngoya, Japan, 1993; WHO VPH/93. 122.
5. Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis. Manual de Leptospirosis. Buenos Aires; Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico; 1994:37.
6. Wilbur LA, Aubert MFA. The NIH test for potency. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*, 4 ed. Geneva: WHO, 1996:360-8.
7. Habel K. Habel test for potency. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*, 4 ed. Geneva: WHO, 1996:369-71.
8. WHO. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. Geneva: World Health Organization. 1990:87-179. (Technical Report Series 800).
9. USA. US Code of Federal Regulations. Animal Plant Health Inspection Service, USDA. 113.101. *Leptospira pomona* bacterin. 113.102. *Leptospira icterohaemorrhagiae* Bacterin. 113.103. *Leptospira canicola* Bacterin. 9 CFR Ch.I (1-1-91 Edition): 513-515. (Documento Regulatorio).
10. Argentina. Servicio Nacional de Sanidad Animal. Disposición No. 405/88. Control de calidad de bacterinas contra la leptospirosis. Manual de leptospirosis. V. Control de potencia. En: Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis. Manual de leptospirosis. 1994:51-3. (Documento Regulatorio).
11. USA. Food and Drug Administration. Preparation of freeze-dried cultures of *Bordetella pertussis*. Rockville, Center for Biologics Evaluation and Research. Lab of Pertussis 1992. (Documento Regulatorio).
12. Otsuka S, Manako K. Studies on the preservation of *Leptospira* by freeze-drying. *Japan J Microbiol* 1986;5(2):141-8.
13. Palit A, Haylock LM, Cox JC. Storage of pathogenic leptospire in liquid nitrogen. *J Appl Bacteriol* 1986;61:407-11.
14. Korean Green Cross Corporation. Information on *Leptospira* Vaccine-KGCC. Seoul:Korean Green Cross Corporation, 1994.
15. European Pharmacopoeia, 1989. Vaccinum leptospirosis ad usum veterinarium (*Leptospira* Vaccine for Veterinary Use):447-447-2. (Documento Regulatorio).
16. 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.
17. Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965;26:45-51.
18. Habel K. Habel test for potency. Annex: Calculating 50 % end-point dilutions by the method of Reed and Muench. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneva: WHO, 1996:371-2.

Recibido: 25 de enero de 1997. Aprobado: 18 de julio de 1997.
Lic: *Esther María Fajardo*. Instituto "Finlay". Ave. 27 No. 19805.
La Lisa, Ciudad de La Habana. Cuba, Código Postal 11600.