

INSTITUTO "CARLOS J. FINLAY"

Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok en medio EMJH modificado

Lic. Andrés González Rodríguez,¹ Téc. Niurka Batista Santiesteban,² Téc. Yolanda Valdés Abreu³ y Lic. Marta González González⁴

RESUMEN

Se evaluó la influencia de concentraciones crecientes de Tween 80 en el medio sintético EMJH sobre el crecimiento, la virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok, para incrementar los rendimientos y aprovechar al máximo la capacidad destoxicante de la albúmina sérica bovina. El crecimiento fue evaluado espectrofotométricamente mediante el análisis de la cinética del crecimiento bacteriano, los rendimientos de biomasa obtenidos y el consumo de la fuente de carbono. La virulencia fue estimada en el modelo hámster sirio y la antigenicidad fue determinada mediante la técnica de microaglutinación frente a un antisuero policlonal de conejo. Bajo condiciones de cultivo controladas, el incremento de la concentración de Tween 80 hasta 3, 25 mg/mL determinó una aceleración del metabolismo bacteriano, que logró duplicar los rendimientos celulares con un consumo total de la fuente de carbono, sin afectación de la virulencia y antigenicidad durante numerosos subcultivos sucesivos.

DeCS: LEPTOSPIRA INTERROGANS/ aislamiento & purificación; LEPTOSPIRA INTERROGANS/crecimiento & desarrollo; VIRULENCIA; MEDIOS DE CULTIVO; LEPTOSPIROSIS/diagnóstico; TESTS DE AGLUTINACION; ALBUMINA SERICA BOVINA.

El medio sintético EMJH^{1,2} con albúmina sérica bovina y polisorbato 80 (Tween 80) es considerado un medio superior a otros medios de cultivo tradicionales que contienen suero de conejo como constituyente esencial.³ Los ácidos grasos libres producto de la hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres del Tween 80, son tóxicos para las leptospiras a concentraciones relativamente bajas.⁴ La albúmina permite el crecimiento de las células en mayores niveles de Tween 80 dado su carácter destoxicante y estabilizador, al ser capaz de unir a su estructura los ácidos grasos libres en el medio de cultivo y de esta forma neutralizar su actividad

citofítica.⁵ Este medio proteico es actualmente el más utilizado para el aislamiento y cultivo de cepas de *Leptospira*, en ocasiones en grandes volúmenes durante la obtención de inóculos para la producción de antígenos vacunales en medio libre de proteínas. Sin embargo, el alto costo de sus componentes, en particular la albúmina sérica bovina, incrementa significativamente los costos de producción de vacunas y las investigaciones básicas de laboratorio.

El presente estudio fue realizado con el objetivo de evaluar la influencia de niveles crecientes de Tween 80 como fuente de carbono y energía sobre

¹ Licenciado en Microbiología.

² Técnico Medio en Química Industrial.

³ Técnico Medio en Veterinaria.

⁴ Licenciada en Biología.

el crecimiento, la virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar *mozdok*, con el empleo de la misma concentración de albúmina normalmente utilizada para el medio EMJH, para incrementar los rendimientos celulares y aprovechar al máximo la capacidad destoxificante de esta proteína sérica.

MÉTODOS

CEPA BACTERIANA

En el estudio fue utilizada la cepa vacunal 108 de *Leptospira interrogans*, perteneciente al serogrupo Pomona serovar *mozdok*; la cual fue originalmente aislada a partir de material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario, de Ciudad de La Habana. En todos los ensayos fueron utilizados como inóculos, cultivos de 6 d crecidos en medio EMJH bajo condiciones de temperatura y agitación controladas (130 rpm, 28-30 °C), que mostraran buen crecimiento, viabilidad y alta virulencia en el modelo hámster sirio.

MEDIO EMJH MODIFICADO Y CONDICIONES DE CULTIVO

El medio EMJH fue modificado por incremento de la concentración de Tween 80 desde 1,25 mg/mL (normal) hasta 1,75; 2,25; 2,75; 3,25; 3,75; 4,25; 4,75 y 5,25 mg/mL, incluidas 3 réplicas de cultivo para cada concentración y el medio EMJH normal como control en todos los ensayos. Se emplearon en el estudio erlenmeyers para cultivo de una capacidad de 500 mL, que contenían 100 mL de medio fresco inoculado, hasta lograr una densidad óptica inicial de 0,1 medida a 400 nm en espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia). Todos los cultivos fueron incubados bajo condiciones controladas durante 6 d, y se realizaron ensayos de pureza antes y después del período de incubación con el objetivo de detectar un posible crecimiento de contaminantes.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

El crecimiento fue estimado espectrofotométricamente ($\lambda=400$ nm), con la realización

de conteos microscópicos con cámara de Petroff-Hausser para verificar las lecturas espectrofotométricas. El rendimiento celular fue determinado y expresado como gramos de biomasa húmeda por litro de medio empleado. Fueron analizadas las cinéticas de crecimiento del microorganismo con el cultivo en el medio modificado. El consumo de la fuente de carbono fue determinado calentando el sobrenadante a 56°C durante 30 min y tomando la apreciación de turbidez como indicativo de Tween 80 no consumido.⁶ Los resultados del crecimiento fueron comparados estadísticamente mediante la prueba de Duncan.

ESTIMACIÓN DE LA VIRULENCIA

Grupos de 5 animales de 45-50 g de peso fueron inoculados intraperitonealmente con 0,8; 0,4; 0,1 y 0,05 mL de cada cultivo bacteriano ajustado a $7,5 \times 10^7$ leptospiras/mL; luego los animales se observaron durante 14 d posinoculación. La cepa fue considerada altamente virulenta si produjo la muerte de al menos todos los animales inoculados con 0,8-0,1 mL de la suspensión bacteriana. Con menores niveles de letalidad la cepa fue considerada de virulencia moderada o baja.⁷ Fue determinado además el valor de dosis letal media (DL_{50}) de la cepa y expresado como el número correspondiente de células microbianas.⁸

EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD

La antigenicidad fue determinada mediante la técnica de aglutinación microscópica (MAT),⁹ enfrentando las células a un antisuero policlonal de conejo anti-*Leptospira interrogans* *mozdok* e incluye la cepa de referencia 5621 como control.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

Luego de un primer subcultivo en el medio EMJH modificado, el crecimiento de la cepa 108 se incrementó proporcionalmente al aumento de la

concentración de Tween 80 ($p < 0,01$), al menos hasta 3,25 mg/mL, y mantuvo buena viabilidad y uniformidad celular. A concentraciones superiores de Tween 80 los niveles de ácidos grasos tuvieron un progresivo efecto negativo sobre el crecimiento celular y las concentraciones de 4,25 a 5,25 mg/mL resultaron extremadamente citolíticas. Aun cuando en 3,75 mg/mL el rendimiento celular fue superior al obtenido con el cultivo en el medio EMJH control, el crecimiento se afectó apreciablemente, evidenciado por un incremento de las células muertas en el cultivo (fig. 1). En todas las concentraciones estimuladoras del crecimiento ocurrió un consumo total de la fuente de carbono y energía, no así en las concentraciones extremadamente líticas donde se apreció un exceso de Tween 80 no consumido en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos.

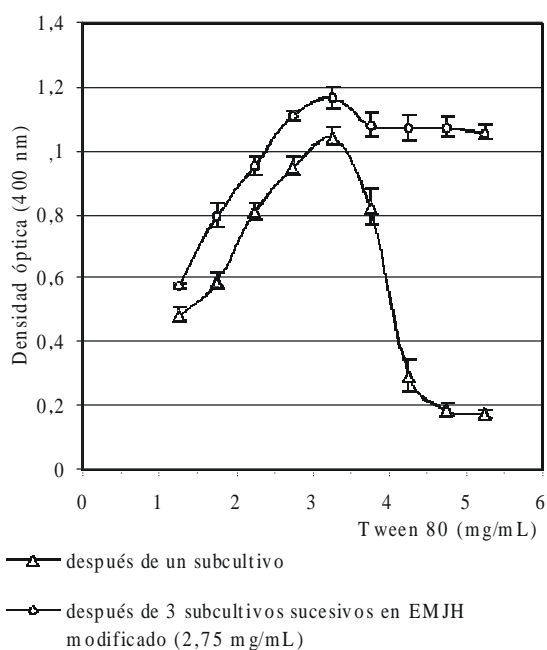


Fig. 1. Crecimiento de *Leptospira interrogans* serovar mozdok cepa 108 en medio EMJH modificado con concentraciones crecientes de Tween 80.

Después de 3 subcultivos sucesivos del microorganismo en presencia de altas concentraciones de ácidos grasos (2,75 mg/mL), los resultados de una nueva evaluación evidenciaron un excelente crecimiento, viabilidad

y uniformidad celular con un consumo total de la fuente de carbono y energía en todas las concentraciones de Tween 80 analizadas, incluso en aquellas que fueron extremadamente líticas para la cepa antes de los subcultivos sucesivos en el medio modificado (fig. 1). El crecimiento de la cepa subcultivada también se incrementó notablemente ($p < 0,01$) con el aumento de la concentración de Tween 80 hasta 2,75 mg/mL, por encima de la cual un incremento adicional, al menos hasta 5,25 mg/mL, no tuvo efectos apreciables en los rendimientos celulares obtenidos. No obstante, los rendimientos logrados en este segundo ensayo fueron muy superiores ($p < 0,05$) a los obtenidos por la cepa antes de los subcultivos en todas las concentraciones de Tween 80 analizadas.

En ambos ensayos, los rendimientos de biomasa obtenidos fueron proporcionales a las lecturas espectrofotométricas y a los conteos microscópicos en cámara de Petrooff-Hausser. De esta forma el rendimiento se incrementó desde 0,72 g/L en EMJH hasta 1,65 g/L con el cultivo en el medio modificado (3,25 mg/mL); mientras la concentración celular se incrementó desde 2×10^9 leptospiras/mL hasta 5×10^9 leptospiras/mL, respectivamente. Sin embargo, tras varios subcultivos en el medio modificado se lograron rendimientos de biomasa de 1,95 g/L, con una concentración cercana a 10^{10} leptospiras/mL a 3,25 mg/mL de la fuente de carbono y energía.

Al comparar las cinéticas de crecimiento de la cepa 108 crecida en medio EMJH y EMJH modificado se apreció un incremento de la velocidad específica de crecimiento de $1,8 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ a $2,7 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ y una disminución del tiempo de duplicación de 38,5 h a 25,7 h al incrementar la concentración de Tween 80 hasta 3,25 mg/mL (fig. 2). Esta aceleración metabólica determinó que los cultivos en el medio modificado, alcanzaran en fase logarítmica temprana los mismos rendimientos celulares logrados en EMJH al final de esta fase de crecimiento, tan solo con el empleo de la mitad del tiempo de incubación.

ESTIMACIÓN DE LA VIRULENCIA

Al analizar la virulencia de la cepa 108, luego del cultivo a concentraciones elevadas de ácidos grasos, no se apreció disminución de la capacidad

de producir infección letal en hámsters, cuando el microorganismo se cultivó en presencia de concentraciones iguales o inferiores a 3,25 mg/mL de Tween 80. Resultados similares fueron obtenidos después de uno o varios subcultivos de la cepa en el medio modificado, se mantuvo un valor de DL_{50} de 3 a 6 células aproximadamente. Sin embargo, la virulencia se afectó notablemente con concentraciones superiores a 3,25 mg/mL de la fuente de carbono y energía, aun cuando el crecimiento y las características culturales fueran excelentes. Fueron realizados al menos 8 subcultivos sucesivos de la cepa 108 en el medio modificado (3,25 mg/mL) y en todos los casos la cepa se mantuvo altamente virulenta y produjo la muerte de los animales entre el 4 y el 7 d posinoculación.

EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD

Al comparar la antigenicidad de la cepa 108, crecida en altas concentraciones de ácidos grasos, con la cepa crecida en el medio EMJH control no se apreciaron diferencias en la capacidad de

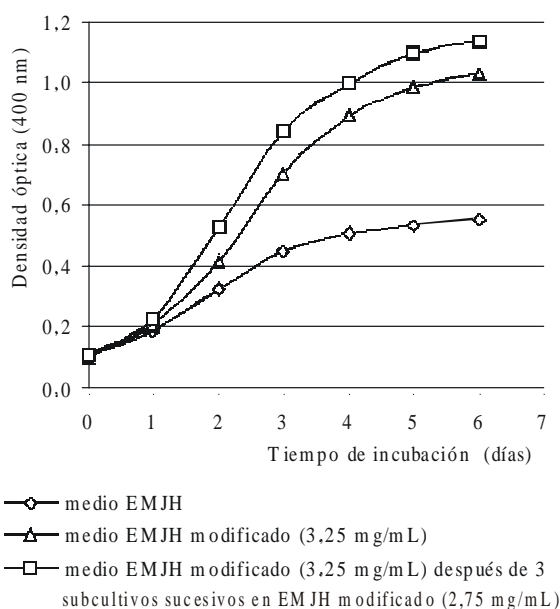


Fig. 2. Cinéticas de crecimiento de *Leptospira interrogans* serovar mozdok cepa 108 en medio EMJH y EMJH modificado (3,25 mg/mL).

reaccionar con el antisuero policlonal homólogo mediante MAT. Resultados similares fueron obtenidos después de varios cultivos sucesivos del microorganismo en el medio modificado.

DISCUSIÓN

La importancia de los ácidos grasos en la nutrición y metabolismo de *Leptospira* ha sido ampliamente reconocida; sin embargo, estos presentan una alta citotoxicidad para el microorganismo incluso a concentraciones subóptimas para el crecimiento.^{1-3,9,10} La albúmina sérica bovina funciona en el medio EMJH como un *carrier* de material lipídico en estado no tóxico, que mantiene la concentración de ácidos grasos libres por debajo de los niveles bacteriolíticos, mientras los ácidos grasos unidos a su estructura constituyen una reserva que repone aquellos que van siendo utilizados por el microorganismo. Varios estudios indican que cada molécula de albúmina es capaz de unir de 4 a 6 moléculas de ácido graso, por 3 clases diferentes de sitios de unión.⁵ De esta forma se establece un equilibrio estabilizador entre los ácidos grasos libres en el medio de cultivo y los ácidos grasos unidos a la albúmina. Este equilibrio destoxificante se mantendrá mientras existan sitios de unión disponibles en la molécula proteica. Cuando estos sitios son saturados, aparece un exceso de ácidos grasos libres que producen un progresivo efecto negativo sobre el crecimiento y la fisiología del microorganismo.⁴

Los resultados de este trabajo sugieren que en el medio EMJH la capacidad destoxificante de la albúmina no ha sido completamente saturada, dado que un incremento sustancial de la concentración de Tween 80 bajo condiciones de cultivo controladas, al menos hasta 3,25 mg/mL, lejos de tener un efecto tóxico estimula el crecimiento celular y ocasiona una aceleración del metabolismo microbiano. Una respuesta adaptativa de cepas de *Leptospira*, a mayores niveles de ácidos grasos, ha sido reflejada con anterioridad tras el cultivo reiterado en medios sintéticos libres de proteínas.¹⁰ Los resultados obtenidos indican que los subcultivos sucesivos en medio EMJH, modificado con concentraciones de Tween 80 estimuladoras del crecimiento, ocasionan cambios

fisiológicos en la célula que permiten una tolerancia adaptativa a niveles superiores de ácidos grasos libres. De esta forma, la cepa adaptada es capaz de lograr excelentes características culturales a concentraciones extremadamente elevadas de ácidos grasos (>3,25 mg/mL), cuyos efectos citotóxicos serían letales para la cepa no adaptada. Sin embargo, el cultivo, en presencia de estos elevados niveles de ácidos grasos libres, desencadena afectaciones irreversibles en la virulencia del microorganismo.¹⁰

El uso del medio EMJH modificado por incremento de la concentración de Tween 80 hasta niveles permisibles, bajo condiciones controladas de cultivo, tiene obvias ventajas tanto para la producción de vacunas como para las investigaciones de laboratorio. Por su parte, el empleo de cepas adaptadas, que toleren altas concentraciones de ácidos grasos, pudiera contribuir a incrementar los rendimientos de biomasa obtenidos en los medios libres de proteínas, empleados en la producción de antígenos vacunales de *Leptospira interrogans*.

SUMMARY

The effect of higher Tween 80 concentrations in EMJH synthetic medium on the growth, virulence and antigenicity of *Leptospira interrogans* serovar mozdok was evaluated for increasing the performances and making a full use of the detoxifying capacity of bovine serum albumin. The growth was spectrophotographically evaluated by the analysis of the bacterial growth kinetics; the obtained biomass performance and the consumption of the carbon source. The virulence was estimated in Syrian Hamster model whereas antigenicity was determined through the microagglutination technique in rabbit's polyclonal antiserum. Under controlled culture conditions, the increase of Tween 80 concentration up to 3,25 mg/ml brought about an acceleration in bacterial metabolism that managed to double cell performances

with a full consumption of the carbon source, without affecting virulence and antigenicity for a number of successive subcultures.

Subject headings: LEPTOSPIRA INTERROGANS/isolation & purification; LEPTOSPIRA INTERROGANS/growth & development; VIRULENCE; CULTURE MEDIA; LEPTOSPIROSIS/diagnosis; AGGLUTINATION TESTS, SERUM ALBUMIN, BOVINE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperature. *J Bacteriol* 1967; 92:27-31.
3. Ratnam S. A manual on leptospirosis. Madras: S.R. Publications, 1994:22-3.
4. Shenberg E. Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *J Bacteriol* 1966; 93:1598-606.
5. Davis BD, Dubos RJ. The binding of fatty acids by serum albumin, a protective growth factor in bacteriological media. *J Expt Med* 1947; 86:215-28.
6. Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H. International Course in Laboratory Techniques for the Diagnosis of Leptospirosis. Amsterdam: Royal Tropical Institute, 1997: 71-80.
7. Cuba. Ministerio de la Agricultura. Norma Ramal 673. Diagnóstico Veterinario de la Leptospirosis, 1982.
8. Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gaínza N, Izquierdo L, Hernández Y, et al. Normalización de la DL₅₀ de cepas de *Leptospira interrogans* usadas en el control de la vacuna antileptospirosis cubana para uso en humanos. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50: 22-6.
9. Johnson RC, Gary ND. Nutrition of *Leptospira pomona*. II. Fatty acid requirements. *J Bacteriol* 1963;85:976-82.
10. Stalheim OHV. Leptospiral selection, growth and virulence in synthetic medium. *J Bacteriol* 1966; 92:946-51.

Recibido: 17 de septiembre de 2001. Aprobado: 15 de noviembre de 2001.

Lic. *Andrés González Rodríguez*. Instituto Finlay. Centro de Investigación y Producción de Vacunas y Sueros. Avenida 27 No. 19805, La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba AP 16017. CP 11600. Correo electrónico: andresgles@finlay.edu.cu