

Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* para su uso en vacunas veterinarias

Yaritza Cuba-Romero^{1*}, Noemi Gainza-Santos¹, Niurka Batista-Santiesteban², Alfredo Saltaren-Cobas³, Mariela Naranjo-Medina²

¹ Laboratorio de Leptospira del Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana. Cuba.

² Instituto Finlay. La Habana. Cuba.

³ Centro Provincial de Higiene y Epidemiología. Holguín

email: marielanmar@finlay.edu.cu

Uno de los criterios más importantes para el desarrollo de inmunógenos de *Leptospira* es contar con cepas bien caracterizadas por su virulencia y representativa de los serogrupos circulantes desde el punto de vista clínico y veterinario. Todo lo cual permite garantizar inmunógenos capaces de proteger contra los serovares presente en la formulación y que afectan a los animales en riesgo. Este trabajo se realizó a partir de aislamientos del agente causal de cinco casos clínicos autóctonos de *Leptospira* en la provincia de Holguín, Cuba, mediante métodos convencionales: crecimiento a 13°C, medio suplementado con 8-azaguanina y en presencia de cloruro de sodio. Además, los aislamientos se clasificaron hasta nivel de serogrupo mediante la técnica de microaglutinación. A partir de estos aislamientos fue seleccionada y caracterizada una cepa del serogrupo Ballum como candidato vacunal. Los aislamientos no mostraron crecimiento a 13°C, ni cuando se le añadió al medio 8-azaguanina (2,25 mg/mL), mientras que todas las cepas mostraron conversión a forma esférica en presencia de cloruro de sodio (1M). La clasificación de los aislamientos permitió disponer de dos cepas pertenecientes al serogrupo Ballum y dos a Pomona. La cepa seleccionada mostró alta virulencia y patogenicidad en el biomodelo Hámster Sirio, además de buena estabilidad en los medios de cultivos. Su clasificación hasta el nivel de serovar mediante el uso de anticuerpos monoclonales determinó su pertenencia al serovar Ballum. El presente trabajo, por primera vez, sienta las bases para formulaciones vacunales novedosas en animales, conteniendo el serogrupo Ballum.

Palabras claves: *Leptospira*, Ballum, vacunas.

Introducción

La leptospirosis, es una de las zoonosis más difundidas en el mundo, la padecen por igual el hombre y animales, tanto domésticos como silvestres (1). Este microorganismo pertenece al orden Spirochaetales, a la familia Leptospiraceae y al género *Leptospira*, la cual reúne dos especies *L. interrogans* (patógenas) y *L. biflexa* (no patógena).

Debido al incremento de la incidencia de esta enfermedad, tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados, es de vital importancia el estudio de la misma para la medicina veterinaria y humana.

La clasificación de aislamientos, aunque no es de mucho valor clínico, tiene un gran impacto en los estudios epizootiológicos, ya que nos permite un control estricto de los serogrupos y serovares circulantes en animales en cualquier región geográfica. Además de ser imprescindible en la elaboración de inmunógenos que brinden protección a las especies inmunizadas.

La leptospirosis veterinaria sigue siendo un problema de salud para nuestro país, ya que los animales constituyen la principal fuente de transmisión de la enfermedad al hombre, de ahí la importancia de contar con vacunas veterinarias que cubran todos los serovares circulantes en las especies animales.

El Grupo Empresarial LABIOFAM (La Habana, Cuba), desde 1993 ha desarrollado una vacuna veterinaria, registrada, que incluye las cepas *L. interrogans* serovar Copenhageni, *L. interrogans* serovar Canicola, *L. interrogans* serovar Mozdok, para la protección de las especies porcina, bovina y canina.

Estudios recientes han demostrado que *L. interrogans* serovar Ballum es hoy la cepa de mayor circulación en estas especies (2) y como se puede apreciar este serovar no está incluido en la formulación vacunal existente.

Aunque se han reportado pocos trabajos en los que se evidencia cierta protección cruzada entre los serovares de leptospira (3), existe una opinión generalizada entre

* Doctora, Master en Veterinaria, especialista del laboratorio de Leptospira.

los investigadores de la no existencia de protección cruzada entre serogrupos/serovares que conforman una misma formulación (3), de ahí que cobre gran importancia la inclusión de los serovares de mayor circulación en el país en las formulaciones utilizadas, con el fin de conferir mayor protección a los animales y por ende al hombre.

Para contar con inmunógenos capaces de proteger a las especies inmunizadas, es imprescindible la clasificación y caracterización de aislamientos de los serovares que conforman la formulación, por lo que este trabajo de investigación tiene como propósito clasificar por métodos fenotípicos y serológicos aislamientos clínicos pertenecientes al serogrupo Ballum para su futura inclusión en formulaciones vacunales.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

La selección de las cepas candidatas vacunales se realizó a partir de cinco aislamientos clínicos de *Leptospira* procedentes del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Holguín.

Estos aislamientos se obtuvieron de personas con sintomatología compatible con una leptospirosis en diferentes centros asistenciales de esta provincia, entre marzo y junio del 2012. Todas las cepas se aislaron por hemocultivo en el medio Korthoff (4).

Como controles en los diferentes ensayos se utilizaron las cepas vacunales 87, 169 y 108, pertenecientes a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, respectivamente, integrantes de la vacuna Polivalente-Leptospira.

Estas cepas se aislaron originalmente a partir de un material remitido al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de La Habana y donados por el Instituto Finlay al Laboratorio Biológico y Farmacéutico LABIOFAM.

Todas las cepas se conservaron en el medio semisólido Fletcher a 28-30°C (5) y se mantuvieron siempre mediante cultivos en el medio proteico Korthof, bajo condiciones estáticas a 28-30°C en el Departamento de Microbiología de LABIOFAM.

La virulencia de las cepas vacunales y de los aislamientos se mantuvo a través de pases periódicos en hámsteres (6).

Caracterización de los aislamientos en patógenos y no patógenos mediante métodos fenotípicos convencionales

a) Prueba de crecimiento a 13°C de temperatura

La prueba fue realizada a los cinco aislamientos, con la utilización como control patógeno una cepa vacunal *L. interrogans* serovar Copenhageni y como control no patógeno la cepa *L. biflexa* serovar Patoc. Todo el estudio se realizó en tubos de cristal de 15 mL con rosca, los cuales se inocularon con 0,1 mL del medio crecido proveniente de un cultivo estático de 5-7 días en el medio proteico Korthoff, con una concentración de 2×10^8 leptospira/mL y 10 mL de medio fresco.

Los tubos se incubaron a 13°C de temperatura. Posteriormente se verificó el crecimiento a los 7, 14, 21 y 30 días post-inoculación, mediante observaciones bajo el microscopio de campo oscuro. En cada muestreo se observaron características culturales como motilidad, uniformidad celular y se realizaron controles de pureza a los cultivos mediante tinción de Gram, siembra en caldo triptonsoya y caldo tioglicolato. La evaluación de cada cepa se realizó por triplicado.

b) Prueba de 8-azaguanina (2,25 mg/mL)

Primeramente se procedió a preparar una suspensión de 8-azaguanina a una concentración de 2,25 mg/mL, utilizando como disolvente agua destilada. Posteriormente la suspensión se diluyó añadiendo 1mL de esta suspensión a 9 mL de medio Korthoff fresco, con ayuda de un agitador magnético. Seguidamente la suspensión se esterilizó durante 20 min a 121°C. A continuación se inoculó 0,1mL del medio de cultivo proveniente de un cultivo estático de 5-7 días en el medio proteico fresco con una concentración ajustada de 2×10^8 células/mL (conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser), de cada una de las cepas a evaluar y se procedió a incubar a 28-30°C.

Se monitoreó el crecimiento a los 7, 14, 21 y 30 días post-inoculación mediante la observación al microscopio de campo oscuro. En cada muestreo se procedió como se describe más arriba.

c) Conversión a formas esféricas en NaCl (1M)

Se disolvió NaCl (1M) en 10 mL de agua de calidad farmacéutica, la cual fue previamente esterilizada durante 15 min a 121°C. Posteriormente se adicionó 1 mL de esta suspensión a 7 mL de medio Korthoff fresco. Se procedió a inocular 0,7 mL de una suspensión celular de cada una de las cepas en estudio, provenientes de un cultivo

estático de 5-7 días en el medio proteico Korthof, con una concentración ajustada de 2×10^8 células/mL (conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser). Se incubó a 28-30°C por 2 h y a continuación se procedió a verificar las formas esféricas por observación bajo el microscopio de campo oscuro cada 20 min durante 1 h. Cada cepa se evaluó por triplicado.

Clasificación de los aislamientos hasta el nivel de serogrupo

La clasificación de los aislamientos hasta el nivel de serogrupo se realizó mediante la técnica de microaglutinación microscópica (MAT) (7), con el empleo de antisueros policlonales de referencia específicos para los 11 serogrupos circulantes en Cuba (8): Ballum, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Tarassovi, Australis, Hebdomadis, Bataviae, Automnalis y Sejroe, producidos en el Laboratorio de Referencia Internacional de Leptospirosis del Instituto Tropical de Holanda y donados por el Instituto Finlay al Laboratorio Biológico y Farmacéutico LABIOFAM.

Como controles, se utilizaron las cepas de referencia Mus 127 y Arborea (Ballum), 5621 (Pomona), Hond Utrecht IV (Canicola), M20 (Icterohaemorrhagiae), Salinen (Pyrogenes), Perepelicin (Tarassovi), Ballico (Australis), Hebdomadis (Hebdomadis), Van Tiene (Bataviae), Akiyami A (Automnalis) y Hardjoprajitno (Sejroe). Todas estas cepas forman parte de la colección INPPAZ/OPS, donada al Instituto Finlay por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Esta técnica se realizó con antígenos vivos y la incorporación de las respectivas cepas homólogas de referencia como controles de aglutinación para cada antisuero.

Animales de experimentación

En este trabajo se utilizó el biomodelo animal *Mesocricetus auratus*. Se emplearon animales de ambos sexos, con un peso entre 45-60 g, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba) con sus correspondientes certificados de calidad higiénico-sanitaria y genética.

Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24°C), humedad (20-25%), ciclo alternado de luz/oscuridad de 12 h y recibieron alimentación y agua acidulada *ad libitum*. Para todos los experimentos, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en cajas metálicas y en grupos individuales de 5 animales por caja.

Todas las operaciones de esta investigación se realizaron siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), establecidas en los Procedimientos Normalizados de Operaciones (PNO), elaborados por la Dirección de Calidad del Grupo Empresarial LABIOFAM y se tuvieron en cuenta las normas y regulaciones bioéticas vigentes, tanto nacionales como internacionales. En todos los ensayos que implicaron el uso de los animales de experimentación se cumplieron los principios generales bioéticos, así como del manejo de los animales de laboratorio.

Evaluación cualitativa de la virulencia

Para la realización de este ensayo solo se utilizaron los aislamientos pertenecientes al serogrupo Ballum. Este ensayo se realizó según la metodología descrita por González y cols., (9). Se inocularon por vía intraperitoneal (IP), grupos de cinco animales, con dosis de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 mL de una suspensión bacteriana ajustada a 8×10^6 células/mL (conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser), proveniente de un cultivo estático de 5-7 días en el medio proteico Korthof.

Los animales inoculados se observaron durante un periodo de 14 días post-inoculación. Como criterio de aceptación de este ensayo, se estableció que las cepas que produjeran la muerte de todos los animales inoculados con dosis menor o igual a 0,2 mL de la suspensión bacteriana se consideraran altamente virulentas. En cambio si la muerte de los animales fue producida con dosis entre 0,4 y 0,8 mL las cepas fueron consideradas con moderada virulencia y para menores niveles de letalidad las cepas se clasificaron como de baja virulencia o avirulentas.

Selección inicial de las cepas candidatas vacunales

La selección de las cepas candidatas vacunales se basó en los resultados de la clasificación serológica, es decir, que pertenecieran al serogrupo Ballum y además mostraran una alta virulencia en el modelo animal.

Clasificación serológica hasta el nivel de serovar

Una vez seleccionada la cepa 245-12 como candidata vacunal, por su virulencia, se clasificó hasta el nivel de serovar mediante la técnica MAT utilizando un panel de cuatro anticuerpos monoclonales (AcM F74C1-6, AcM F74C4-4, AcM F74C7-3 y AcM F74C12-1) producidos por el laboratorio de Referencia Internacional de Leptospirosis del Instituto de Medicina Tropical de Holanda y donadas por el Instituto Finlay a los Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos LABIOFAM.

Determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀)

La determinación de la DL₅₀ de la cepa seleccionada, en el biomodelo Hámster Sirio, se realizó según la metodología propuesta por Reed y Muench (10). A partir de un cultivo en fase exponencial crecido en medio proteico Korthof bajo condiciones controladas de cultivo estático a 28-30°C de temperatura. Se preparó una suspensión bacteriana con una concentración celular equivalente a 10-12 leptospiras por campo de observación, bajo microscopio de campo oscuro, para lo cual se diluyó el cultivo en medio Korthof fresco.

A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas en el mismo medio de cultivo desde 10⁻³ hasta 10⁻⁷. Grupos de 5 animales fueron inoculados con 0,5 mL de cada dilución por vía IP.

Los animales se sometieron a una observación clínica durante 14 días, evaluándose la aparición de signos clínicos que indicaran la presencia de la enfermedad como: pilo erección, excitabilidad, ictero de piel y las mucosas, hemorragias a través de los orificios naturales, postración y muerte. Para expresar la mortalidad en porciento se empleó la formula siguiente:

Mortalidad % = (Número de animales muertos / Total de animales inoculados) x 100

Como controles negativos se utilizaron animales inoculados con el medio líquido Korthof.

Resultados y Discusión

Caracterización de los aislamientos en patógenos y no patógenos mediante métodos fenotípicos convencionales

a) Prueba de crecimiento a 13°C de temperatura

Las cinco cepas aisladas, así como la cepa control perteneciente al serogrupo *L. interrogans* serovar copenhageni, no manifestaron crecimiento a la temperatura de 13°C lo que concuerda con lo planteado por Gallegos y Sandí (11). Mientras que la cepa *L. biflexa* serovar Patoc, si mostró crecimiento a la temperatura de 13°C coincidiendo también con lo planteado por estos autores.

Nuestros resultados concuerdan con lo señalado por diversos autores (12) quienes expresan que las especies patógenas de leptospira no manifiestan crecimiento a bajas temperaturas mientras que las no patógenas (*L. biflexa*) presentan 35 genes de ARN-t que pudieran estar

influyendo en el rápido crecimiento de estas a bajas temperaturas.

b) Prueba de 8-azaguanina (2,25 mg/mL)

Los aislamientos en estudio así como la cepa *L. interrogans* serovar Copenhageni utilizada como control, no manifestaron crecimiento en el medio selectivo rico en 8-azaguanina (2,25 mg/ml), mientras que la cepa control *L. biflexa* serovar Patoc, mostró un correcto crecimiento.

Estos resultados están en concordancia con lo planteado por Gallegos y Sandí (11), quienes plantean que la inhibición del crecimiento de las cepas patógenas bajo condiciones favorables para el crecimiento de las cepas saprófitas es el principal criterio de diferenciación entre ellas. Las cepas patógenas en un medio de cultivo selectivo rico en 8-azaguanina no manifiestan crecimiento ya que las mismas no tienen la capacidad de incorporar bases de pirimidinas exógenas en sus ácidos nucleicos.

La mayoría de los medios de cultivo se mantuvieron libres de contaminantes y donde se observó crecimiento (*L. biflexa* serovar Patoc), el microorganismo presentó una correcta motilidad y uniformidad celular.

c) Conversión a formas esféricas en NaCl (1M)

Bajo la observación al microscopio de campo oscuro, los aislamientos se presentaron como formas esféricas y brillantes. La OMS en el año 2008 planteó que las cepas patógenas de leptospira se presentan de esta manera una vez que se le añade NaCl (1M) al medio de cultivo, debido a la conformación elástica de su membrana citoplasmática. Igualmente la cepa patógena control *L. interrogans* serovar Copenhageni mostró conversión a forma esférica.

Estos resultados muestran que a los 20 min de aplicado el NaCl (1M) comenzó a observarse la conversión a formas esféricas, mientras que la cepa de *L. biflexa* serovar Patoc, no mostró cambios en su forma, lo cual puede estar dado por que las cepas saprófitas mantienen su forma espiral al ser expuestas a este compuesto, debido a la alta resistencia a la conversión manifestada por estos microorganismos (12).

Las cepas patógenas mostraron, de forma homogénea y gradual, la conversión a células esféricas hasta el tiempo máximo observado, 60 min.

Los controles de pureza para el aislamiento 336-12 no fueron satisfactorios debido a que se encontró presencia de hongos en los mismos, por lo que finalmente se decidió rechazar este aislamiento.

Clasificación de los aislamientos hasta el nivel de serogrupo

Los antisueros policlonales y monoclonales específicos de referencia a *Leptospira* son producidos en muy pocos laboratorios especializados bajo procedimientos normalizados internacionalmente. Aunque en los últimos años han sido introducidos una gran variedad de modernos métodos para el análisis genético, el tipaje y la clasificación de cepas de *Leptospira*; la clasificación serológica mediante la técnica de microaglutinación constituye aún el método más utilizado, a pesar de ser laboriosa y limitada para la clasificación hasta serogrupo, si no se dispone de una batería de anticuerpos monoclonales (13).

La clasificación serológica realizada por la técnica de MAT, utilizando anticuerpos policlonales de referencia, a los cinco aislamientos caracterizados como patógenos, permitió la identificación de dos serogrupos (Tabla 1), entre los 11 que circulan entre humanos en Cuba (14).

Esta clasificación determinó que los serogrupos presentes fueron Pomona (50%) y Ballum (50%), resultados que concuerdan con Obregón y cols., (14) quien expresa que en los últimos diez años se ha observado una alternancia entre ambos serogrupos, en lo referente a la prevalencia epidemiológica. Como es conocido los cerdos son los principales reservorios del serogrupo Pomona, mientras que las ratas y ratones lo son del serogrupo Ballum (14).

Esta alternancia entre ambos serogrupos puede deberse a que las condiciones higiénico-sanitarias del país se han visto afectadas por prácticas no convencionales como la cría de cerdos sin las normas necesarias y el insuficiente control de los roedores. Situación que ha conllevado al aumento de la incidencia. Además, en la Tabla 1 se muestran, para ambas cepas, los títulos por la técnica de MAT frente a los antisueros policlonales utilizados.

Estos resultados confirman una vez más la alta presencia del serogrupo Ballum entre los serogrupos de mayor circulación en las especies animales (de cuatro aislamientos, dos pertenecen al serogrupo Ballum, lo que representa el 50%) y la necesidad de incluir el serogrupo Ballum dentro de la formulación vacunal existente.

Evaluación cualitativa de la virulencia

Aunque la virulencia de los microorganismos patógenos es casi siempre cuantificada en modelos animales mediante el cálculo de la dosis letal media, en este trabajo se utilizaron métodos cualitativos de estimación de la virulencia que, aunque menos exactos, fueron

Tabla 1. Clasificación serológica de las cepas aisladas.

No	Serogrupos	Título por MAT
248-12	Pomona	1:1024
245-12	Ballum	1:2048
172-12	Pomona	1:512
192-12	Ballum	1:1024

igualmente reproducibles y requirieron muchos menos animales, lo que los hace más apropiados para estimar simultáneamente esta capacidad en un gran número de cepas (15).

La determinación de la virulencia en hámsteres como segundo criterio de selección de las cepas candidatas vacunales, proporcionó la división de las cepas pertenecientes al serogrupo Ballum en dos categorías; alta y moderada virulencia.

La cepa 245-12 mostró una elevada virulencia en el biomodelo animal empleado, lo que determinó su selección como cepa candidata vacunal, ya que produjo la muerte de todos los animales inoculados con dosis menores o iguales a 0,2 mL de la suspensión bacteriana.

Es sabido que existen factores asociados a la membrana externa de las cepas virulentas que intervienen activamente en la inmunogenicidad y son capaces de brindar un resultado real de la protección del candidato vacunal lo cual constituye el principal correlato de protección (16), de ahí que la virulencia sea uno de los criterios principales para la selección de las cepas.

Por otra parte la cepa 192-12 mostró una virulencia moderada y por consiguiente no fue seleccionada como candidata vacunal. Este diferente comportamiento entre cepas de un mismo serogrupo puede estar dado por lo planteado por diversos autores, quienes expresan que pases sucesivos en los medios de cultivos influyen negativamente en la virulencia, debido a la pérdida de importantes factores asociados a la misma en las cepas de leptospiras (17).

Una vez aisladas, las cepas son mantenidas en cultivos de agar semisólido al 2% (medio Fletcher) y hasta el momento en que son trabajadas en el laboratorio son sometidas a varios subcultivos.

Esta metodología influye negativamente en el mantenimiento de la virulencia, pues es bien conocido que los subcultivos seleccionan aquellos microorganismos que tienen mayor tasa de crecimiento, y un aumento de esta propiedad, por lo general, está correlacionado con la pérdida de factores de virulencia.

Tabla 2. Relación entre el total de animales vivos y muertos por dilución del inóculo.

Dilución de inóculo	Muertos	Vivos	Relación de Muertos / Total	%
10 ⁻³	5	0	5/5	100
10 ⁻⁴	5	0	5/5	100
10 ⁻⁵	4	1	4/5	80
10 ⁻⁶	3	2	3/5	60
10 ⁻⁷	1	4	1/5	20

Algunos factores de virulencia de *Leptospira* que se pierden con los pases o subcultivos en medios microbiológicos son las proteínas *flaA* y *flaB* relacionadas con la motilidad (17) y las proteínas ligA y ligB de unión a fibronectina presentes solamente en cepas patógenas (18).

Clasificación serológica de la cepa seleccionada hasta el nivel de serovar

El tipaje con los anticuerpos monoclonales arrojó como resultado que la cepa 245-12 pertenece al serovar Ballum, con un título de 1:1028.

Determinación de la DL₅₀

Numerosos estudios han mostrado diferencias sustanciales en la expresión de los antígenos importantes en la patogénesis de la enfermedad leptospirósica, entre cepas isogénicas virulentas y avirulentas.

Esta desigual arquitectura antigénica al parecer se revierte en una desigual capacidad protectora de unas y otras cepas, al ser incluidas en preparados vacunales de células enteras (3-18); de ahí la importancia de que las cepas seleccionadas muestren una elevada virulencia en los modelos animales y sea este otro importante criterio de selección.

Utilizando la metodología descrita por Reed y Muench para el cálculo de la DL₅₀, obtuvimos como resultado una DL₅₀ = 6,25 células, lo que sitúa a esta cepa dentro de la clasificación de cepa altamente virulenta y corrobora los resultados encontrados en la evaluación cualitativa de la misma (Tabla 2).

Estos resultados están en correspondencia con aquellos comúnmente mostrados por cepas de *Leptospiras* altamente virulentas obtenidos por otros investigadores (9). Además se encuentran dentro del mismo rango de DL₅₀ obtenido para las cepas que conforman la vacuna Polivalente-*Leptospira*.

Referencias

1. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2015;387: 65-97.
2. Teresa PP. Leptospirosis animal en Cuba. En: Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis: Espiroquetas. Palacio de las Convenciones, La Habana, 5-7 de mayo, 2010. La Habana. IPK; 2010:10-1.
3. González M, Martínez R, Cruz R, Infante J, González I, Baró M et al. vax-SPIRAL®. Vacuna antileptospirósica trivalente para uso humano, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. *Biotec Aplic* 2004;2(2):107-11.
4. Korthof G. Experimentelles schlammeieber beim menschen. *Zentr Bakteriell Parasitenk Abt I Orig A* 1932;125:429-32.
5. 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.
6. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: WHO;1982.
7. Cole J, Sulzer C, Pursell A. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 1973;5:65-9.
8. Rodríguez I, Obregón A, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Hig Epidemiol* 2002;40(1):11-5.
9. González A, Batista N, Valdés Y, González M. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok en medio EMJH modificado. *Rev Cub Med Trop* 2002;54(1):32-6.
10. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938;27(3):493-7.
11. Gallegos A, Sandí V. Leptospirosis. *Rev Med Costa Rica Centroam* 2010;592:115-21.
12. Picardeau M, Bulach D, Bouchier C, Zuerner R, Zidane N, Wilson P, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2008;3:1599-1607.
13. González A. Evaluación de la potencialidad vacunal de dos cepas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. [Tesis de Maestría]. La Habana: Facultad de Biología, Universidad de La Habana; 2003.

14. Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Zamora Y. Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 2007;59(1):1-7.
15. Fajardo E, Ortiz B, Chávez A, Gainza N, Izquierdo L, Hernández Y, et al. Estandarización de la dosis 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Cub Med Trop* 1998;50(1):22-6
16. Colleen L, Lau C, Smythe L, Weinstein P. Leptospirosis: An emerging disease in travellers, *Travel Medicine and Infectious Diseases* 2010;8(1):33-9.
17. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* 2007;75(5):2441-50.
18. Croda J, Figueira C, Wunder E, Santos C, Reis M, Ko AI, et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira*: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun* 2008;76(12):5826-33.

Characterization of clinical isolates of *Leptospira* for veterinary vaccines

Abstract

One of the most important approaches for the development of *Leptospira* immunogens is to have very well characterized strains by their virulence and which are representative of the circulating serogroups from the clinical and veterinarian point of view. All of this allows to guarantee immunogens capable to protect against the serovars present in the formulation and that affect animals at risk. This paper was carried out from isolations of the causal agent of five autochthonous clinical cases of *Leptospira* at Holguín, by means of phenotypic conventional methods: growth at 13°C, in supplemented media with 8-azaguanina and in the presence of sodium chloride. The isolations were also classified until serogroup level by the microagglutination technique. A strain of Ballum serogroup was selected and characterized from these isolations as a vaccinal candidate. The isolations did not show growth at 13°C, not even when 8-azaguanina (2.25 mg/mL) was added to the culture, while all the strains showed conversion to spherical form in the presence of sodium chloride (1M). The classification of the isolations allowed having two strains belonging to the serogroup Ballum and two to Pomona. The selected strain showed high virulence and pathogenicity in the Syrian Hamster bio model, as well as a good stability in the culture media. Its classification until the serovar level by means of the use of monoclonal antibodies determined that it belonged to the Ballum serovar. The present paper sets for the first-time the bases for novel vaccinal formulations in animals, containing the serogroup Ballum.

Keywords: *Leptospira*, Ballum, vaccines.

Recibido: Abril de 2015

Aceptado: Mayo de 2015