

PREPARACION Y PRUEBA DE UNA VACUNA EXPERIMENTAL  
CONTRA LA LEPTOSPIROSIS  
EN MESOCRICETUS AURATUS

Por

Alcides Montiel Montiel

Tesis

Presentada a la consideración del Honorable Tribunal Examinador, como requisito parcial para obtener el Título de  
INGENIERO AGRONOMO

Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería  
Managua, Nicaragua, C. A.

1964

PREPARACION Y PAUSEA DE UNA VACUNA EXPERIMENTAL  
CONTRA LA LEPTOSPIRILOSIS  
EN MESOCYCLIDACTYLUS AULATUS

Por

Alcides Montiel Montiel

Tesis

Presentada a la consideración del Honorable Tribunal Examinador, como requisito parcial para obtener el Título de  
INGENIERO AGRONOMO

Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería  
Managua, Nicaragua, C. A.

1964

Dedico este trabajo

A mis padres: Fernando Montiel F.  
Elba Montiel de Montiel

A mis hermanos y

compañeros.

## RECONOCIMIENTOS

El autor agradece la valiosa cooperación que los profesores de la Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería, Dr. Lawrence G. Clark y Sr. Víctor M. Varela-Díaz, Miembros de la Misión Científica de la Universidad de Pennsylvania, prestaron en la realización del presente trabajo.

Así mismo, agradece al Sr. Director de la Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería, Ing. Orlando Lindo E. por su contribución a su formación profesional.

Al Dr. Juan L. Eguaras por sus oportunos consejos.

## INDICE

Introducción .....	1
Literatura Revisada .....	2
Materiales y Métodos .....	8
Resultados Experimentales .....	25
Conclusiones .....	27
Resumen .....	28
Bibliografía .....	29

## LISTA DE CUADROS

Cuadro #1	Pasajes iniciales en Hamsters para Incrementar la virulencia de la cepa .....	12
Cuadro #2	Preparación de la cepa virulenta para la determinación del LD <sub>50</sub> .....	14
Cuadro #3	Pasajes por Hamsters. Aumento de virulencia - de la cepa para la prueba inicial de la vacuna	19
Cuadro #4	Determinación del LD <sub>50</sub> . Pasajes 16 y 23 patrones de muertes .....	20
Cuadro #5	Uso Inicial a la Vacuna .....	22
Cuadro #6	Determinación del ED <sub>50</sub> .....	23

## LISTA DE TABLAS Y CUENAS

Tabla #1	Análisis para encontrar el LD <sub>50</sub> .....	21
Tabla #2	Preparación del ED <sub>50</sub> .....	24
Gráfica #1	Gráfica que demuestra el aumento de virulencia de la cepa en relación al tiempo y el número de pasajes para la preparación de la vacuna .....	13
Gráfica #2	Pasajes en Hamster que demuestra el aumento de virulencia de la cepa retante para la determinación del LD <sub>50</sub> .....	17
Gráfica #3	Gráfica que demuestra el tiempo que tardaron los Hamsters en morir en relación con el número de pasajes .....	18

Las vacunas del tipo de las bacterinas son frecuentemente usadas con el propósito específico de proteger a los animales contra infección.

El objetivo principal de este trabajo consistió en la preparación de una bacterina experimental contra la Leptospira canicola en el hamster Mesocricetus auratus, la prueba de dicha vacuna y encontrar su potencia ( $ED_{50}$ ).

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de la Misión Científica de la Universidad de Pennsylvania, Departamento de Industria Animal, Estación Experimental "La Calera" del Ministerio de Agricultura y Ganadería. El trabajo se efectuó en el período de tiempo comprendido entre el 3 de Mayo de 1963 al 7 de Mayo de 1964.

La cepa utilizada fue L. canicola aislada en Nicaragua del gato coyocebo Urocyon cinereoargenteus. Se le aumentó la virulencia mediante pasajes consecutivos por hamsters y se cultivó en medio líquido de Stuart. La vacuna se preparó matando a los organismos con formalina. Se comprobó la esterilidad de la vacuna.

Para la preparación de la cepa retante se continuaron los pasajes de leptospiras por hamsters hasta encontrar el  $LD_{50}$ . Este se utilizó para retar a los hamsters vacunados. Finalmente se encontró el  $ED_{50}$ .

Los datos encontrados se analizaron estadísticamente para encontrar el  $LD_{50}$ , para probar la vacuna y para encontrar el  $ED_{50}$ .



## LITERATURA REVISADA

La leptospirosis es una enfermedad cuyo agente etiológico es una bacteria del Orden Spirochaetales, Familia Treponemaceae, género *Leptospira* (7). Todos los organismos pertenecientes a este género son de aspecto morfológico básicamente similar (15). Estos son microorganismos filiformes, flexibles, cuyo diámetro aproximado es de 0.1 micrón y su longitud de 5 a 15 micrones. Sus extremos se encuentran doblados formando ganchos (12). Las leptospiras sólo pueden observarse bajo el microscopio de campo oscuro (15).

Hasta el momento se han identificado 60 serotipos de leptospiras, pero sólo se ha comprobado la existencia de siete serotipos en Mesoamérica (de México a Panamá). En Puerto Rico, donde la leptospirosis aparece en forma hiperendémica, se han diagnosticado infecciones humanas con 6 serotipos: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. djatzi*, *L. ballum*, *L. grippotyphosa*, *L. alexi* y *L. borincana* (1).

No se sabe verdaderamente la distribución de la leptospirosis en la América Latina. En estos últimos años se ha sacado mucha información acerca de la leptospirosis de las zonas húmedas tropicales y subtropicales. Aunque este ambiente se encuentra en el Caribe y la América del Sur son relativamente pocos los lugares donde se sabe algo acerca de la leptospirosis y mucho menos donde esta enfermedad ha sido investigada. Varela y sus colaboradores trabajando en México encontraron *L. icterohaemorrhagiae* en un grupo de ratas y también en un grupo de 8 perros enfermos, observaron *L. canicola*. En América Latina casi todas las leptospiras se han relacionado con la cepa *L. icterohaemorrha-*

giae. Además, se ha observado L. canicola en Cuba, Puerto Rico, Jamaica, Argentina, Brasil y Uruguay (1).

Como portadores de esta enfermedad se considera tanto a las ratas y ratones del campo como también a los perros, así como a diversos mamíferos domésticos y salvajes (4). En las ratas esta enfermedad se presenta como una epizootia en la que se han vuelto tolerantes y la infección es natural, ya que algunos roedores pueden expulsar leptospiras durante el resto de su vida (13).

La infección la pueden adquirir tanto los animales como el hombre al ponerse en contacto con aguas contaminadas, con orina de animales enfermos, al bañarse en estanques o charcos o al pasar por terrenos pantanosos, penetrando la leptospira a través de las grietas de la piel. Otra vía de infección es a través de las mucosas, cuando éstas se ponen en contacto con aguas contaminadas o membranas fetales infectadas (10). Generalmente cuando el hombre ingiere alimentos contaminados con orina de ratas infectadas, adquiere la enfermedad (13).

Las leptospiras se pueden encontrar localizadas en el lumen de los túbulos tortuosos de los riñones. Se elimina el organismo en la orina de los huéspedes, excretándose grandes cantidades de leptospiras, en algunos casos hasta 100 millones por mililitro. Al caer la orina contaminada en el agua o barro con un pH neutro o ligeramente alcalino, estas pueden sobrevivir durante varias semanas (4).

Las lesiones principales se encuentran tanto en el hígado como en los riñones. Las alteraciones anatómo-patológicas se presentan en estos mismos órganos. También se presentan hemorragias puntiformes en

la piel, las mucosas y las vísceras. El hígado se observa congestionado y algo recrecido con pequeñas áreas necróticas. Los riñones pueden estar hinchados y sufrir alteraciones degenerativas en las células hepáticas de los túbulos tortuosos (13).

Se pueden encontrar las leptospiras en la sangre a los tres o cuatro días de haber adquirido la infección y la temperatura comienza a descender después de los dos a los cinco días (13). La formación de anticuerpos se acelera generalmente, después del sexto al duodécimo día post-infección, llegando a alcanzar los títulos más altos a la tercera o cuarta semana (8).

La infección leptospiral del ganado vacuno puede resultar en una infección moderada en unos casos, y en otros aguda y mortal. En los días siguientes a la infección hay fiebre, pérdida del apetito, la producción de leche se reduce y la orina se encuentra sanguinolenta. El animal se encuentra anémico y esto puede ser debido como resultado de la pérdida de sangre. Como la producción de leche se reduce, pasarán varias semanas antes de que la producción vuelva a su normalidad (17).

Uno de los métodos más seguros para el diagnóstico de la leptospirosis es aislar el agente causante de la enfermedad. En sólo los primeros días de la enfermedad se deben tomar muestras de sangre para hemocultivo. Los cultivos se incuban a una temperatura de 37° C y se están examinando cada siete días durante un mes. También se puede cultivar del mismo modo que la sangre, la orina del animal tomada asépticamente (16).

Cuando el material de que se dispone está contaminado, es necesario hacer pasajes por animales de laboratorio para purificarlos.

Entre los cuatro y siete días después de la inoculación, se toman muestras de sangre por punción cardíaca (16).

Los animales más usados son los cobayos jóvenes de aproximadamente 200 gramos de peso, pero muchos serotipos no causan infección mortal en estos animales. Las ratas y ratones blancos son frecuentemente portadores naturales de leptospiras por lo que no se aconsejan para tratar de aislar a estos microorganismos. También se han usado hamsters jóvenes, de 3 a 6 semanas de edad, que han dado muy buenos resultados en el aislamiento de ciertos serotipos (como L. canicola y L. grippotyphosa), cuando los cobayos no han sido efectivos (16). La leptospira canicola no es patógena para las ratas por ser éstas resistentes al agente. Los cobayos resisten la infección de L. canicola pero no las infecciones de L. icterohaemorrhagiae (11).

La prueba de aglutinación microscópica se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en la sangre. Cuando el suero de animales infectados por un serotipo dado se mezcla con cultivos vivos de diferentes cepas de leptospiras, éstas se ven aglutinadas y lisadas al campo oscuro. Al hacer diluciones en serie se puede determinar el título del suero (17). Se pueden observar títulos que varíen desde 1:10 hasta 1:300,000, los cuales pueden persistir durante varios meses después de pasada la infección (11).

La inmunidad activa se emplea generalmente con fines profilácticos, mientras que la inmunidad pasiva se emplea para combatir el agente causante de la enfermedad (6).

En la preparación de las bacterinas, generalmente se emplean medios adecuados para el cultivo del germen específico. Cuando el medio

de cultivo es satisfactorio, se recoge el germen separándolo del medio y finalmente se suspende en suero fisiológico, para después matarlo ya sea por calor, formalina o radiaciones ultravioleta (6). La mayoría de las bacterinas comerciales se preparan en medios líquidos de cultivo con 10% de suero de conejo (14).

En animales infectados las bacterinas no alteran el curso de la enfermedad. Se puede controlar la distribución de leptospiras en hatos infectados por medio de inmunización profiláctica. En los lugares donde la enfermedad es endémica se acostumbra reinmunizar el ganado a intervalos de 6 a 9 meses (14).

Yanagawa et al en la preparación de una vacuna con la cepa L. autumnalis, cultivaron leptospiras en medio líquido de Cox y las incubaron a 30° C por 7 a 14 días. El líquido fue centrifugado y luego decantado suspendiendo el sedimento en una solución buffer fosfatada (pH = 7.2). Para matar los organismos le añadieron una solución fenol al 0.5% y la incubaron a 37°C durante 24 horas. La vacuna preparada contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> organismos por ml, determinados con una cámara contadora. Después de inoculada la cepa retante, no se observó leptospiremia en los animales vacunados pero sí en el control. Después de los 21 días post-reto no se observaron leptospiras en los riñones de los ratones vacunados, mientras que 11 de los 12 ratones de control resultaron positivos (19).

Wood y Alexander usaron una cepa L. canicola aislada de un perro para la preparación de una cepa de reto en un experimento con hamsters. Por medio de pasajes sucesivos se mantuvo la virulencia de la cepa.

Inocularon 1 o 3 gotas de sangre extraída del corazón del hamster en los medios de cultivos de Fletcher; y los cultivos de 6 a 10 días sirvieron de material de reto. Los cultivos de las diluciones  $10^{-3}$  o  $10^{-5}$  fueron los que se utilizaron para infectar a los hamsters inyectando intraperitonealmente una dosis de 0.5 ml. El  $LD_{50}$  para los respectivos niveles de dilución en cada serie del experimento fue de  $10^{-6.5}$   $10^{-8}$  (18).

Brunher y Meyer concluyeron que, cultivos de L. canicola de medio de Schüffner, tratados con una solución de alumbre al 0.1%, puede concentrarse por centrifugación e inactivarse por congelación. Una dosis de 0.001 ml de ese antígeno protegió a los hamsters en que se probó, mientras que una dosis de 0.5 ml. le confirió una sólida inmunidad a perritos usados en estos experimentos. Estos antígenos no eran inmanogénicos para L. icterohaemorrhagiae. Utilizando el mismo procedimiento para la preparación de antígeno, con la cepa clásica de ratones, se confirió a los hamsters una completa protección al usar dosis no menos de 0.05 ml. Para inmunizar perros contra cepas homólogas un mínimo de mililitros de antígeno inoculado en dos pasos fue requerido (3).

Morter et al, el uso de las bacterinas L. pomona ha sido acompañada de síntomas sugestivos de anafilaxis. Diez días después de estar vacunado el ganado con la bacterina L. pomona se volvió a revacunar, y los animales presentaron señales de hipersensibilidad. Se consideró al suero de conejo asociado con las bacterinas leptospirales como el agente causante de las reacciones anafilácticas (14).

Brown et al en la evaluación de una bacterina para controlar la enfermedad en hatos infectados resultaron que la vacuna de L. pomona

era efectiva por dos razones: 1.- Tanto los aislamientos del organismo como los estudios serológicos indicaron que sólo una especie de leptospira, L. pomona, ha sido identificada como el agente causante de la enfermedad. 2.- Que para proteger a los animales necesariamente los títulos en el suero deben de salir altos (2).

#### MATERIALES Y METODOS

Para la preparación de la vacuna se empleó una cepa de Leptospira canicola aislada en Nicaragua del gato coyotebo Urocyon cinereogentens (5). Esta se transfirió a medio semisólido de Fletcher (Difco), con suero de conejo al 10 por ciento, se examinó al microscopio de campo oscuro y se escogió el cultivo donde se observó el mejor crecimiento. Para aumentarle el poder patógeno a la bacteria se hizo una serie de pasajes sucesivos por hamsters. Se les inoculó por la vía intraperitoneal 1 cc. del cultivo de L. canicola a cada uno de dos hamsters. Se aislaron en cajas metálicas provistas de suficiente agua y alimento. A uno de ellos se le cortó la oreja derecha para poder diferenciarlos y se pesaron diariamente en una balanza calibrada en gramos.

Al observarse una pérdida de peso, se procedió al aislamiento de la cepa, matando al hamster que mostraba mayor descenso en su peso. Se le dió muerte por ahogamiento, sumergiéndolo en una solución acuosa de Boccia al 10 por ciento durante 10 o 15 minutos. Luego se colocó al hamster en posición supina clavándolo a una tabla pequeña.

Las necropsias se hicieron en un cuarto de luz ultravioleta para disminuir considerablemente las posibilidades de contaminación. Las tijeras y las pinzas se desinfectaron sumergiéndolas en alcohol al 95 por

ciento y exponiéndolas seguidamente a una llama. Se ~~obtuvo~~ <sup>obtuvo</sup> una sección de hígado y se echó en un macerador estéril, agregándole ~~varios~~ <sup>varios</sup> mililitros del medio líquido de Stuart (Difco) con 10 por ciento de suero de conejo. Se trituró hasta obtener una suspensión la que se examinaba microscópicamente para constatar la presencia de leptospiras.

Con esta suspensión se inocularon dos tubos de medio líquido de Stuart y dos de medio semisólido de Fletcher, bajo condiciones asépticas en el cuarto estéril. El hacer esto en cuatro medios servía como medida de seguridad contra la posible pérdida del microorganismo. Luego se tomaron 2 cc. de la suspensión de tejido de hígado macerado en una jeringa estéril y se inocularon intraperitonealmente dos hamsters con 1 cc. cada uno. Para este segundo pasaje por hamsters se siguió el mismo procedimiento que se ha descrito para el primer pasaje recién delineado. Estas operaciones se hicieron hasta llegar al pasaje doce.

#### PREPARACION DE LA VACUNA

Del pasaje número doce se aisló la leptospira virulenta, inoculando con ella doce tubos grandes de medio líquido Stuart los cuales se incubaron a 29° C. por ocho días. Al octavo día se observaron al microscopio los medios de cultivo para ver si la densidad de población leptospiral era satisfactoria para la preparación de la vacuna. De no observarse el crecimiento deseado se dejó en incubación durante cuatro días más. Cuando se reexaminaron microscópicamente después de este período, se vertieron los cultivos de población leptospiral satisfactoria que se hallaban contaminados, en una probeta graduada.

En el proceso convenientemente seguido para la preparación de bacterinas, se usa 0.2% por ciento de formalina. En este caso se le agre-



gó formalina, mezclándola bien con un agitador magnético, hasta que se comprobó microscópicamente la muerte de todas las leptospiras. La vacuna así preparada se puso en refrigeración.

#### PRUEBA DE ESTERILIDAD DE LA VACUNA

Para comprobar la esterilidad de la vacuna, se cultivó ésta a 37° C en los siguientes medios de cultivo: Agar de MacConkey (Difco), Agar Verde Brillante (Difco), Caldo Nutritivo (Difco), Caldo Selenite (Difco), y medio semisólido de Fletcher (Difco) con 10 por ciento de suero de conejo.

#### PREPARACION DEL LD<sub>50</sub>

Los pasajes número 16 y 22 se utilizaron para la preparación del LD<sub>50</sub>. Se hizo un cultivo de un trozo de hígado disecado de los hamsters respectivos, del cual se hicieron diluciones en serie (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, hasta 10<sup>-10</sup>) en medio líquido de Stuart.

Se utilizaron grupos de tres hamsters por cada dilución. Los hamsters comprendidos en cada grupo se escogieron al azar de un lote de animales que no diferían en peso unos a otros en más de 15 gramos. Se inoculó 1 cc de la dilución pertinente a cada hamster. Se hizo el análisis estadístico para encontrar el LD<sub>50</sub> de la cepa retante.

#### PRUEBA DE LA VACUNA

Para la prueba de la vacuna se usaron 4 grupos de 4 hamsters, cuyos pesos no tuvieron más de 15 gramos de diferencia. Se inyectó al primer grupo con 1 cc de la vacuna por hamster; al segundo grupo con 0.5 cc y al tercer grupo con 0.25 cc. Se usó un grupo como control.

Se esperó dos semanas después de vacunar a los hamsters antes de inocularlos con la cepa retante, que fue el pasaje número 31. Los ham-

ters se pesaron diariamente antes y después de retarlos. Se mataron a los 15 días post-retos y se examinó la suspensión de riñón macerado en medio líquido Stuart al microscopio para comprobar la presencia de Leptospiras. Se hicieron cultivos en los medios semisólidos de Fletcher y Líquido de Stuart, se incubaron a 20° C y se examinaron semanalmente durante un mes. Los resultados se analizaron estadísticamente.

#### PREPARACION DEL ED<sub>50</sub>

Para hallar el Ed<sub>50</sub> se utilizaron 5 grupos de 4 hamsters, cuyos pesos estaban comprendidos entre 50 y 93 gramos.

Se hicieron diluciones en serie de la vacuna, desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-4</sup> tomándose como pura la vacuna previamente preparada. Se inyectó 0.25 de la dilución respectiva a cada hamster del grupo pertinente, menos a un grupo que se dejó como control. Estos se dejaron dos semanas antes de ser inculados con la cepa retante.

Para retar a los hamsters (vacunados y control) se utilizó 243.23 LD<sub>50</sub>, obtenido del pasaje 39, y se ocupó 0.25 cc para inocular cada animal. Estos se dejaron bajo observación durante los 21 días subsiguientes, pesándolos diariamente. Al final de este período se sacrificaron los hamsters, y las suspensiones de riñón macerado se observaron microscópicamente, para comprobar la presencia de leptospiras. Los resultados se analizaron estadísticamente.

## CUADRO #1

## PASAJES INICIALES EN HAMSTERS PARA INCREMENTAR LA VIRULENCIA DE LA CEPA

Fecha de Inoculación	Material Inoculado	Pasajes	Peso en gramos por Día					Muerte ó Sacrificio	
			1	2	3	4	5		
9 Mayo 1963	Cult. 24	HP <sub>1</sub>	B	66	67		62		0
			D	56	57		52.5	50	+
13 Mayo 1963	Cult. 24 HP <sub>1</sub>	HP <sub>2</sub>	B	95	94	89.5			0
			D	83	83	80	76.5		0
17 Mayo 1963	Cult. 24 HP <sub>2</sub>	HP <sub>3</sub>	B	87	86	85	82	79.5	+
			D	84.5	84	84	81		0
21 Mayo 1963	Cult. 24 HP <sub>3</sub>	HP <sub>4</sub>	B	86.5	85.5	83.5			0
			D	98	96	93	88	86	+
24 Mayo 1963	Cult. 24 HP <sub>4</sub>	HP <sub>5</sub>	B	114			89.5	88.5	+
			D	90			76		0
28 Mayo 1963	Cult. 24 HP <sub>5</sub>	HP <sub>6</sub>	B	88.5	85	82.5	75		+
			D	88	86	83.5			0
31 Mayo 1963	Cult. 24 HP <sub>6</sub>	HP <sub>7</sub>	B	89.5	87.5	85	84	81	+
			D	90	85				0
3 Junio 1963	Cult. 24 HP <sub>7</sub>	HP <sub>8</sub>	B	83	79				0
			D	114.5	113	109	105		+
5 Junio 1963	Cult. 24 HP <sub>8</sub>	HP <sub>9</sub>	B	99	97.5				0
			D	114.5	113.5	112	110		+
7 Junio 1963	Cult. 24 HP <sub>9</sub>	HP <sub>10</sub>	B	118	117.5	116	113		0
			D	79	67.5				0
9 Junio 1963	Cult. 24 HP <sub>10</sub>	HP <sub>11</sub>	B	123	118				0
			D	151	150				0
18 Junio 1963	Cult. 24 HP <sub>11</sub>	HP <sub>12</sub>	B	92	90				0
			D	127	126.5	126	125	124	0

Clave: HP<sub>2</sub> = Pasaje hamster num. 2

H = Hamster

P = Pasaje

2 = Número de pasajes

Cultivo 24 = cultivo con *L. canicola* (nativa)

B = Hamster sin la oreja derecha

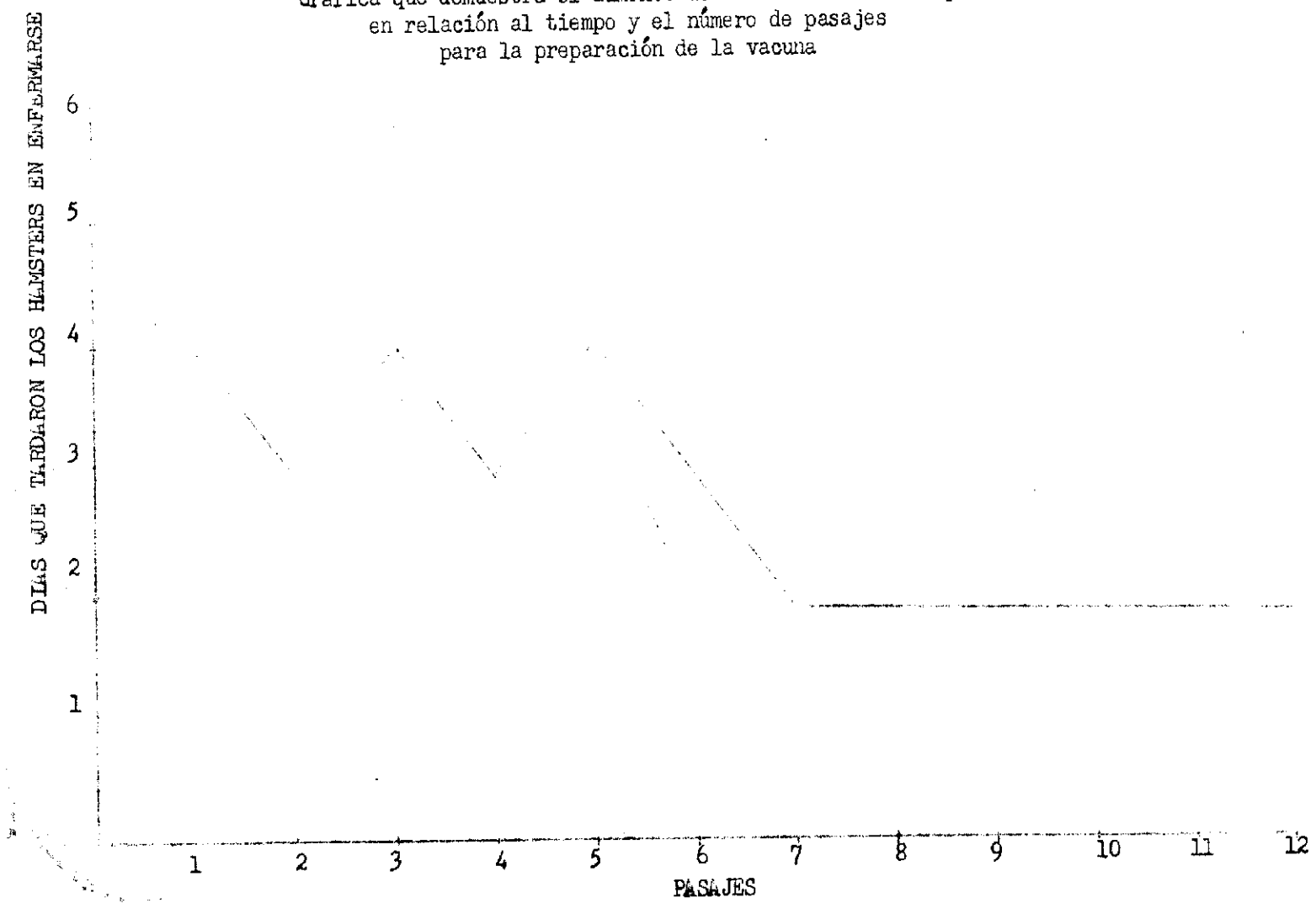
D = Hamster con las 2 orejas

+ = Hamsters que se dejaron morir

0 = Hamsters que se mataron

GRAFICA I

Gráfica que demuestra el aumento de virulencia de la cepa en relación al tiempo y el número de pasajes para la preparación de la vacuna







CUADRO #2 (continuación).....

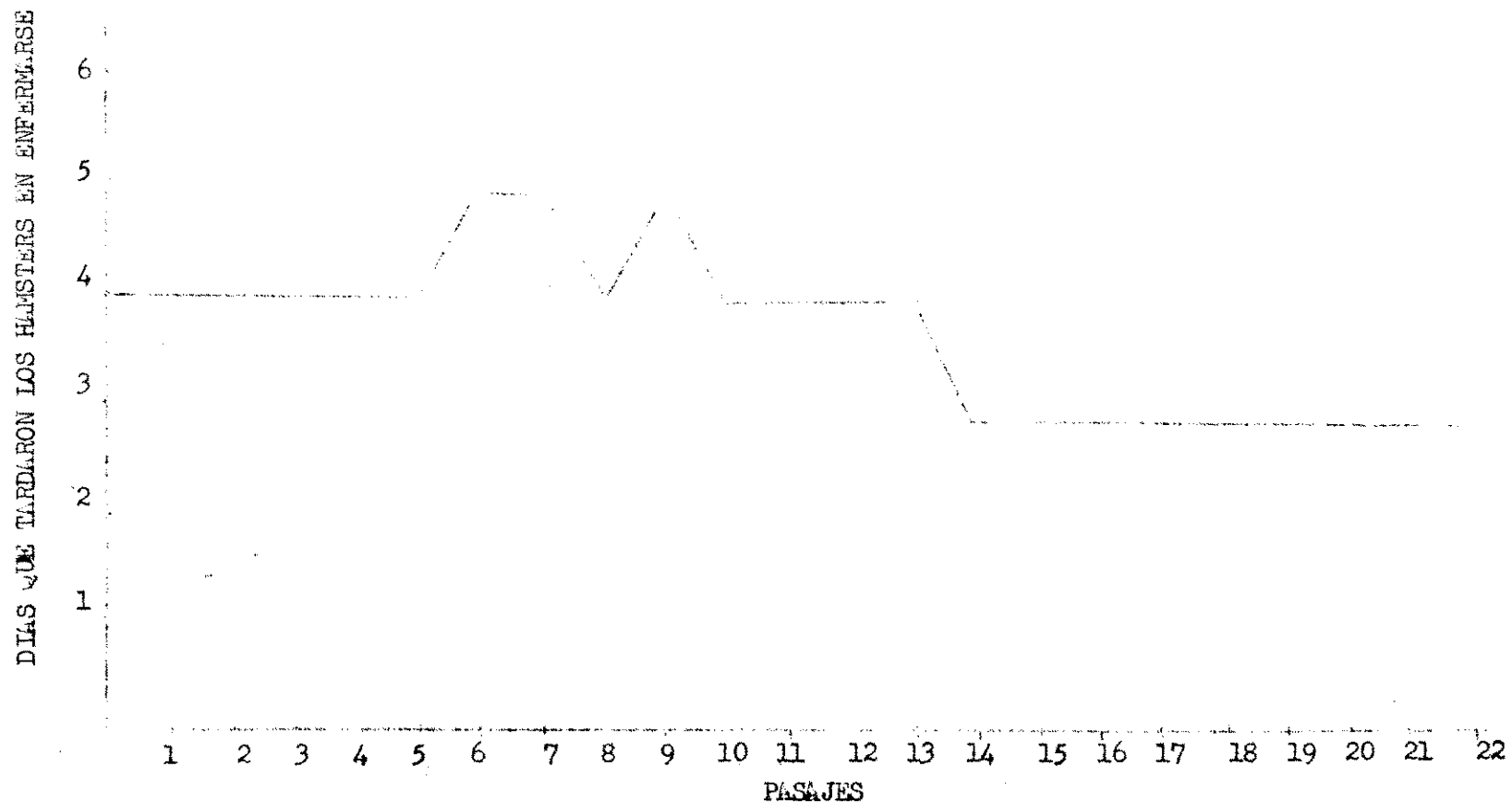
PREPARACION DE LA CEPA VIRULENTA PARA LA DETERMINACION DEL LD<sub>50</sub>

Fecha de Inoculación	Material Inoculado	Pasajes	P E S O S E N G R A M O S P O R D I A																Muerte o Sacrificio		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		17	18
21 Enero 64	HP <sub>18</sub>	B	80	82	80																+
		D	78	75	70																
24 Enero 64	HP <sub>19</sub>	B	108	109	112																+
		D	78	80	80																
27 Enero 64	HP <sub>20</sub>	B	135	136	135																+
		D	90	91	91																
30 Enero 64	HP <sub>21</sub>	B	78	78	76																+
		D	72	73	71																

Clave:

- HP<sub>2</sub> = Pasaje Hamster num. 2
- H = Hamster
- P = Pasaje
- 2 = número de pasaje
- Cult. 24 = cultivo con L. canicola (Nativa)
- B = Hamster sin la oreja derecha
- D = Hamster con las 2 orejas
- +
- +
- = Hamsters que se dejaron morir
- +
- = Hamsters que se mataron

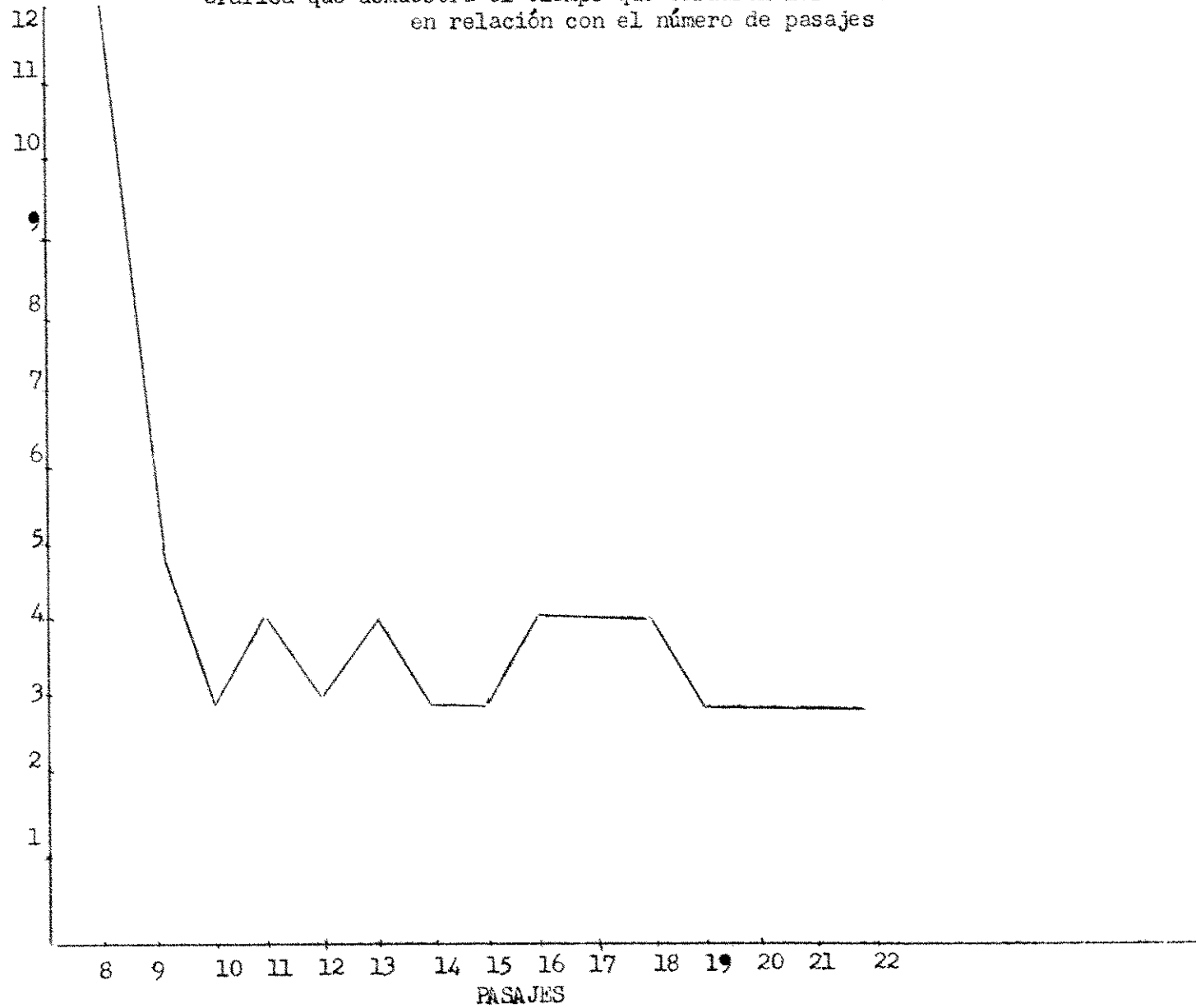
GRAFICA II  
Pasajes en Hamsters  
que demuestran el aumento de virulencia de  
la cepa retante para la determinación del  $LD_{50}$





GRAFICA III

Gráfica que demuestra el tiempo que tardaron los hamsters en morir  
en relación con el número de pasajes



## CUADRO #8

Pasajes por Hamsters  
 ANEXO DE VIGILANCIA DE LA OIEA  
 PARA LA ENFERMEDAD INICIAL DE LA VACUNA

Fecha de Inoculación	Material Inoculado	Pasajes	Pesos en Gramos						Muerte ó Sacrificio	
			1	2	3	4	5	6		
2 Feb 1964	Cult. 24 HP <sub>22</sub>	HP <sub>23</sub>	E	106	105	102				+
			D	114	116	112				∅
5 Feb 1964	HP <sub>23</sub>	HP <sub>24</sub>	E	99	99	95				∅
			D	126	129	126				+
8 Feb 1963	HP <sub>24</sub>	HP <sub>25</sub>	E	106	106	102				∅
			D	112	113	108				+
11 Feb 1964	HP <sub>25</sub>	HP <sub>26</sub>	E	115	113	111				∅
			D	124	123	120				+
14 Feb 1964	HP <sub>26</sub>	HP <sub>27</sub>	E	102	102	96				∅
			D	121	120	119				+
17 Feb 1964	HP <sub>27</sub>	HP <sub>28</sub>	E	137	138	135				∅
			D	123	123	123				+
20 Feb 1964	HP <sub>28</sub>	HP <sub>29</sub>	E	140	140	139				∅
			D	125	126	127				+
23 Feb 1964	HP <sub>29</sub>	HP <sub>30</sub>	E	139	138	138				+
			D	89	90	87				∅
26 Feb 1964	HP <sub>30</sub>	HP <sub>31</sub>	E	121	121	119				∅
			D	144	142	141				+

## Clave:

HP<sub>23</sub> = Pasaje por hamsters No.23

E = Hamster

P = Pasaje

23 = Número del pasaje

E = Hamster sin la oreja derecha

D = Hamster con las dos orejas

+ = Hamsters que se dejaron morir

∅ = Hamsters que se mataron

## CUADRO #4

Determinación del LD<sub>50</sub> - Pasajes 16 y 23

Patrones de muertes

Fecha de Inoculación	Material Inoculado	Diluciones	Muertos/ Inoculados
10 Enero 64	Cult. 24 HP <sub>16</sub>	10 <sup>-1</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-2</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-3</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-4</sup>	2/3
"	"	10 <sup>-5</sup>	3/3
2 Feb 64	Cult. 24 HP <sub>23</sub>	10 <sup>-5</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-6</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-7</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-8</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-9</sup>	3/3
"	"	10 <sup>-10</sup>	0/3

TABLA N° 1  
Análisis para encontrar el LD<sub>50</sub>

Dosis (dilución)	% de muertos
.1	100
.01	100
.001	100
.0001	100
.00001	100
.000001	100
.0000001	100
.00000001	100
.000000001	100
.0000000001	0

Log <sub>10</sub> de la Dilución	Muertos	Resultados Individuales		Resultados Acumulados			Porcentaje de Mortalidad
		Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Total	
-7	3/3	0	3	0	9	9	100
-8	3/3	0	3	0	6	6	100
-9	3/3	0	3	0	3	3	100
-10	0/3	3	0	3	0	3	0

$$pd = \frac{(a-b)(c+d)}{2(ad-bc)} = \frac{(3-0)(0+3)}{2(9-0)} = \frac{3 \times 3}{18} = 0.5$$

$$\begin{aligned} \text{Log de la Dilución} &= -9 \\ + 0.5 \times -1.0 &= -0.5 \\ \text{Log}_{10} \text{ LD}_{50} &= -9.5 \end{aligned}$$

$$\text{LD}_{50} = 10^{-9.5}$$

$$10^{-9.5} \text{LD}_{50} \text{ por ml.}$$

## CUADRO #5

## MÉTODO INICIAL A LA VACUNA

Fecha Inoculación	Dosis de Vacuna	Dosis cepa retante ( $10^{-7.301}$ )	Muertos/ Inoculados
10 Feb 64	1 cc	1 cc	0/4
"	0.5 cc	1 cc	0/4
"	0.25 cc	1 cc	0/4
"	Control	1 cc	4/4

## CUADRO #6

Determinación de LD<sub>50</sub>

Diluciones de la Vacuna	Dosis de la Vacuna	Dosis de la Cepa retante	Cepa Retante	Muertos/Inoculados
Pura	0.25 cc	0.25 cc	243.23 LD <sub>50</sub>	0/4
10 <sup>-1</sup>	0.25 cc	0.25 cc	243.23 LD <sub>50</sub>	1/4
10 <sup>-2</sup>	0.25 cc	0.25 cc	243.23 LD <sub>50</sub>	2/4
10 <sup>-3</sup>	0.25 cc	0.25 cc	243.23 LD <sub>50</sub>	3/4
10 <sup>-4</sup>	0.25 cc	0.25 cc	243.23 LD <sub>50</sub>	3/4
Control	0.25 cc	0.25 cc	243.23 LD <sub>50</sub>	3/4

TABLA #2  
PREPARACION DEL ED<sub>50</sub>

Log <sub>10</sub> de la Dilución	Muertos	Resultados Individuales		Resultados acumulados			Porcentaje de Protección
		Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Total	
Pura	0/4	4	0	4	12	16	75
-1	1/4	3	1	7	12	19	63.3
-2	2/4	2	2	9	11	20	55
-3	3/4	1	3	10	9	19	47.3
-4	3/4	1	3	11	6	17	35.3
Control	3/4	1	3	12	3	15	20

$$pd = \frac{(a-b)(c+d)}{2(ad-bc)}$$

$$= \frac{55-50}{55-47.3} = \frac{5}{7.7} = 0.6$$

$$\text{Log}_{10} \text{ED}_{50} = -2.00 + (0.6 \times -1.0) = -2.6$$

$$\text{ED}_{50} = 10^{-2.6}$$

$$10^{-2.6} \text{ ED}_{50} \text{ por ml.}$$

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Siguiendo el proceso corrientemente usado para la preparación de la vacuna (bacterina), se debía añadir 0.2% de formalina, o sea 0.97 cc. de ésta en los 486 cc. del medio de cultivo utilizado. Sin embargo se necesitaron 2.5 cc. de formalina para poder matar las leptospiras que se encontraban en los 486 cc. Se aumentó hasta 1.53 cc. de formalina, ocupando el 0.51% en vez del 0.2%.

En el cuadro #1, se dan los resultados del peso de los hamsters, el material inoculado, la fecha de inoculación de la misma, los hamsters que se dejaron morir y los que se mataron para la extracción del hígado. En este cuadro se puede observar el número de días que los hamsters tardaron tanto en enfermarse como en morir.

En la gráfica #1, la curva nos demuestra el aumento de la virulencia de la cepa en relación al tiempo y al número de pasajes. Analizando la gráfica se observa que del pasaje uno al seis, los hamsters tardaron entre tres y cuatro días en enfermarse y dos días para los pasajes del siete al doce.

En la prueba de esterilidad de la vacuna no se observa ningún crecimiento en los medios de cultivo, con lo que se comprobó la esterilidad de la vacuna.

El cuadro #2, muestra los resultados del peso de los hamsters y el número de pasajes empleados en la preparación de la cepa virulenta para la determinación del LD<sub>50</sub>. También se da al final del cuadro los hamsters que se dejaron morir y los que se mataron en cada pasaje.

La gráfica #2, nos demuestra el aumento en virulencia de la cepa retante en relación al tiempo que tardaron en enfermarse y el número de



pasajes. De ella se desprende que cuando aumentaba el pasaje por hamsters disminuía el tiempo que tardaban éstos en morir.

En el cuadro #4, se puede observar como se llevó a cabo el proceso para encontrar el  $LD_{50}$ , ocupando para las primeras cinco diluciones el pasaje  $HP_{16}$  y para las otras cinco diluciones el pasaje  $HP_{23}$ . La parte final del cuadro muestra el número de muertos por cada dilución, y se observa que en las diluciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$  murieron todos menos los de la dilución  $10^{-10}$ . El procedimiento seguido para obtener el  $LD_{50}$  se halla en la Tabla #1, resultando 1 cc. de la dilución  $10^{-9.5}$ , el  $LD_{50}$ .

El cuadro #3, ilustra los pasajes subsiguientes para mantener la virulencia de la cepa para la prueba de la vacuna y los pesos de los hamsters. Los resultados de esta prueba se encuentran en el cuadro #5. Todos los vacunados subcutáneamente con las dosis de 1 cc, 0.5 cc. y 0.25 cc. de vacuna y retados intraperitonealmente con 1 cc. de la dilución  $10^{-7.301}$  de la cepa retante no murieron, mientras los hamsters control murieron todos.

Los resultados para la determinación del  $ED_{50}$ , se encuentran en el cuadro #6, donde se presentan las dosis usadas de la vacuna, cepa retante (243.23  $LD_{50}$ ), las diluciones empleadas de la vacuna y el número de muertos en relación a las diluciones y el grupo control.

El análisis para encontrar el  $ED_{50}$  se encuentra en la Tabla #2, siendo éste igual a  $10^{-2.6}$  por ml. Al final de la tabla se da el porcentaje de protección en cada una de las diluciones empleadas en el experimento.

## CONCLUSIONES

Según los resultados del presente estudio, la virulencia de la cepa L. canicola, aumenta con el número de pasajes.

En el pasaje por hamsters No. 7, usado para aumentar la virulencia de la cepa en la preparación de la vacuna, se observó una disminución del peso de los hamsters generalmente al segundo día después de inoculada la cepa de L. canicola, y la muerte ocurrió entre el tercero y cuarto día. En el proceso corrientemente usado para la preparación de las vacunas tipo de las bacterinas se emplea el 0.2% de formalina; pero en este trabajo para poder matar las leptospiras, la concentración de formalina fue de 0.51%. La vacuna conservó su poder antigénico en refrigeración. La determinación de LD<sub>50</sub> ( $10^{-9.5}$ ) que es una dilución bastante alta, comprueba la virulencia de la cepa ocupada para retar a los hamsters vacunados.

En la prueba inicial de la vacuna se observó que una dosis de 0.25 cc. de ésta, inyectada subcutáneamente, protegió a los hamsters inoculados con 1 cc. de la dilución  $10^{-7.391}$  de la cepa virulenta de L. canicola.

En la determinación del ED<sub>50</sub> se comprobó que la vacuna protegía al 50% de los hamsters al inyectar 0.25 cc. de vacuna diluida a  $10^{-2.6}$  y ocupar como cepa retante 0.25 cc. de una dilución que corresponde a 248.23 LD<sub>50</sub>.

De lo que se concluye, que 0.25 cc. de vacuna pura, inoculado por vía subcutánea, protege a los hamsters de 66,829.86 LD<sub>50</sub> inoculadas por vía intraperitoneal.

### RESUMEN

El trabajo se efectuó en el lapso de tiempo comprendido del 3 de Mayo de 1963 al 7 de Mayo de 1964..

El objetivo de esta tesis consistió en la preparación y valoración de una vacuna experimental contra la leptospirosis en Mesocricetus auratus (Hamster).

Leptospira canicola, aislada en Nicaragua del Urocyon cinereo-argenteus (Gato Coyotebo), fue la cepa empleada para la realización de este trabajo.

Para aumentar el poder antigénico de la cepa, se efectuaron 12 pasajes por hamsters; del último se aisló y cultivó en medio líquido de Stuart durante 12 días..

En la preparación de la vacuna se empleó el medio líquido de Stuart inoculado y cultivado, empleando como agente químico para matar la leptospira, formalina al 0.51%..

Para retar a los hamsters vacunados se empleó una cepa con 22 pasajes por hamsters. El título de la cepa resultó  $LD_{50} = 10^{-9.5}$ .

La vacuna diluida al  $10^{-2.6}$  fue la  $ED_{50}$  contra un reto de  $243.23 LD_{50}$ ..

Dosis de 0.25 cc. de vacuna para inyectada subcutáneamente protege a los hamsters de  $06,829.69 LD_{50}$  inoculados por vía intraperitoneal..

## BIBLIOGRAFIA

- 1/ Alexander, A. D.: La distribución de la Leptospirosis en América Latina. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, 59, (Agosto, 1962): 149-161.
- 2/ Brown, A. L., Jensen, J. E., Creamer, A. A. and Scheidy, S. F.: Evaluation of A Leptospira Bacterin Prepared in Culture Medium. Veterinary Medicine, 50, (April, 1955): 167.
- 3/ Brunner, K. T. and Meyer, K. F.: Immunization of Mice and Dogs Against Experimental Leptospirosis. The Journal of Immunology, 64, (May, 1950): 271.
- 4/ Comité Mixto OMS/FAO de Expertos en Zoonosis. Segundo Informe, p 21.
- 5/ Clark, L. G., Varela-Díaz, V. M. and Marsak, M. E.: Leptospirosis en Nicaragua. I. Estudios Propuestos e Informe Preliminar. En Proceso.
- 6/ Cushing, J. E. and Campbell, D. H.: Principios de Immunología. Editorial Acriba, Zaragoza, España. (1960): 2-26.
- 7/ Frobisher, M.: Fundamentals of Microbiology. Fifth Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, (1953): 133.
- 8/ Galton, M. M., Menges, E. W. and Shotts, E. D.: Leptospirosis. Methods in Laboratory Diagnosis: U.S.D.H.E.W., P.H.S., C.D.C., Atlanta, Ga. (1960): 4.
- 9/ Gillespie, R. W. H. and Kenney, S. G.: Immunization of Cattle Against Leptospirosis. I: Comparative Evaluation of Leptospira pomona Bacterins. Veterinary Medicine, 53, (August, 1958): 401.
- 10/ Hanson, L. E.: La Leptospirosis en los Bovinos y los Cerdos. Agricultura de las Américas, (Septiembre, 1961): 52-53.
- 11/ Hagan, W. A. and Brunner, D. W.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. Segunda Edición en Español. La Prensa Médica Mexicana. México, (1961): 421.
- 12/ Jawetz, E. H. y Adelberg, E. A.: Manual de Microbiología Médica. Segunda Edición en Español. Manual Moderno S. A. México, (1960): 210.

- 13/ Mackie, C. F., Hunter, H. E. and North, C. B.: *Manual de Medicina Tropical*. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. La Prensa Médica Mexicana. México, (1948): 25.
- 14/ Morter, M. D., Valentine, E. L. and Tapscot, T.: Anophylaxis in Cattle Receiving Serum-free Leptospirae. *Proc. U.S.L.S.A.*, (Nov, 1962): 140.
- 15/ Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la O.S. *Manual para el Curso sobre Métodos de Laboratorio en Leptospirosis*. (1961): 8.
- 16/ Organización Mundial de la Salud. *Diagnóstico de la Leptospirosis y Tipificación de la Leptospirosis*. No.113. Ginebra, (1967): 5-6.
- 17/ Van Ness, G. B. and Mantel, C. A.: *Leptospirosis*. p. 226. *In Animal Diseases, The Yearbook of Agriculture 1956*. U.S. Govt. Printing Office, Washington, D. C.
- 18/ Wood, E. E. and Alexander, A. B.: The Effect of Selected Antibacterial and Antiprotozoal Agents in Treatment of Leptospirosis in Experimentally Infected Hamsters. *Antibiotics & Chemotherapy*, 10, (June, 1960): 341.
- 19/ Yanagawa, T. Hirakawa, T. and Fujita, J.: The Use of Mice for Vaccinations Studies of Leptospirosis. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 35, (1962): 291-292.
-