

Ars Pharmaceutica

Ars Pharm. 2011; 52(4)

FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD DE GRANADA. ESPAÑA

<http://farmacia.ugr.es/ars>

»» Editorial

Martínez-Martínez F, Faus MJ, Ruiz-López MD.

Originales

- »» Educación sanitaria en la farmacia comunitaria: estudio controlado en la provincia de Castellón.

Castillo-García ML, Martínez-Raga J, López-Castellano AC, Castillo-García E.

- »» Perfil antigénico celular de cepas aisladas de *Leptospira* en León y Chinandega, Nicaragua.

Batista N, Arencibia DF, Rosario LA, Jirón W, Duttman Ch.

- »» Calidad del sueño y consumo de alcohol en una muestra de estudiantes de 18 a 30 años.

Bernabé Muñoz C, García-Corpas JP.

- »» Impacto de los cambios realizados en la etapa de multiplicación celular durante la obtención de la Sustancia Sensibilizante de Eritrocitos utilizada en el diagnóstico serológico de la Leptospirosis.

Arencibia DF, Batista N, Fernández K, Rosario LA, Parra C, Blain K, García L.

Especial

- »» Effect of pharmaceutical intervention on medication adherence and blood pressure control in treated hypertensive patients: Rationale, design and methods of the AFenPA pilot study.

Fikri-Benbrahim N, Sabater-Hernández D, Fikri-Benbrahim O, Faus MJ, Martínez-Martínez F, González-Segura Alsina D.

Ars Pharmaceutica

Impacto de los cambios realizados en la etapa de multiplicación celular durante la obtención de la Sustancia Sensibilizante de Eritrocitos utilizada en el diagnóstico serológico de la Leptospirosis.

Arencibia DF¹, Batista N¹, Fernández K¹, Rosario LA², Parra C¹, Blain K¹, García L¹.

1.Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. (La Habana, Cuba). 2.Instituto de Farmacia y Alimento (La Habana, Cuba).

Original Paper
Artículo Original

Correspondence: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.
Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600, La Habana, Cuba.
e-mail: darencibia@finlay.edu.cu

Received: 11.04.2011
Accepted: 21.09.2011

Competing interests:
Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

RESUMEN

Introducción: En Cuba desde 1981 se tiene implementada la hemoaglutinación indirecta como técnica diagnóstica de Leptospirosis de forma alternativa en ausencia de otras que pueden ser más costosas pero efectivas en los diferentes estadios de la enfermedad. Para el desarrollo de la técnica se hace necesaria la sustancia sensibilizante de eritrocitos (SSE), asumiendo su producción el Instituto Finlay en el año 2009, a partir de una tecnología obsoleta en la etapa de multiplicación celular.

Objetivo. El objetivo de este trabajo fue realizar cambios en esta etapa para obtener la SSE con los medios de cultivos disponibles en la planta de producción para el óptimo rendimiento del producto, sin afectar la actividad biológica como parámetro fundamental de calidad.

Métodos. Fueron formados 8 grupos experimentales teniendo en cuenta: cepa productora (cepa LABIOFAM y cepa Finlay) medio de cultivo (MK y EMJH) y condiciones de cultivos (estático o agitado).

Resultados y conclusión. Se obtuvo como resultado que la mejor variante fue en la que se utilizó la cepa de LABIOFAM, crecimiento en medio MEJH y agitado, con una disminución considerable en el tiempo de obtención de la SSE mediante esta nueva tecnología, con un título consistente con las exigencias de calidad. Permitiendo así comenzar los diferentes diseños de estudios de estabilidad y registro del producto.

PALABRAS CLAVE: Leptospirosis, diagnóstico serológico, sustancia sensibilizante de eritrocitos.

ABSTRACT

Introduction: In Cuba since 1981 has implemented the indirect hemagglutination as an alternative technique of Leptospirosis diagnosed, in the absence of others that may be more costly but effective at different stages of the disease. For the development of the technique requires the Erythrocytes Sensitize Substance (ESS), assuming the production Finlay Institute in 2009, from obsolete technology in the process of cell multiplication.

Objective: The aim of this study was to make changes at this stage to obtain the ESS with the culture media available at the plant for optimum product performance, without affecting the biological activity as the basic parameter of quality.

Methods: Eight experimental groups were formed according to multifactorial design, taking into account: production strain (LABIOFAM or Finlay strain of *L. biflexa* Patoc I), culture medium (MK and MEJH) and culture conditions (static or agitated).

Results and conclusion: We obtained as a result that the best variant was the combination (LABIOFAM strain, growth in MEJH and agitated), with a considerable decrease in the time of the ESS obtaining by means of this new technology, with a consistent title with the demands of quality. This work allowed to use the best variant to begin the different designs of stability studies of the product.

KEY WORDS: Leptospirosis, serological diagnosis, erythrocytes sensitize substance.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis humana constituye para Cuba un problema de salud, ya que afecta desde el punto de vista económico y social a toda la población que se expone temporal o permanentemente al riesgo de infección. Desde la puesta en marcha del Programa de Control y Prevención de esta enfermedad en el año 1981 por las autoridades de Salud Pública del país, se ha registrado una tendencia ligeramente ascendente de la morbilidad disminuyendo con la aplicación de una vacuna cubana como medida profiláctica contra la enfermedad¹.

Como parte importante de este Programa de Control y Prevención se tiene implementada la hemoaglutinación indirecta HAI como técnica diagnóstica, que permite detectar la enfermedad en fase aguda y en la etapa de convalecencia, como una alternativa debido a la incapacidad para poner en práctica una gran variedad de modernos métodos los cuales han surgido en los últimos años debido a sus altos costos; esta técnica ha sido usada y sigue siendo usada por los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología de todas las provincias del país con diferentes grados de éxito^{2,3}. Desde el año 1983 hasta el año 2008 los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) asumieron la producción de la Sustancia Sensibilizante de Eritrocitos (SSE), comúnmente conocida como antígeno de *Leptospira*, fue asumida esta producción para el diagnóstico de laboratorio cumpliendo los más estrictos procedimientos de control para satisfacer la demanda nacional.

En el año 2009 las autoridades de salud le piden al Instituto Finlay que transfiera este producto como parte de la cantera de biológicos que ya están disponibles en dicho centro. Para lograr tales objetivos se realiza una transferencia tecnológica desde LABIOFAM hasta la Vicepresidencia de Investigaciones involucrando a la Dirección del Calidad, y la Vicepresidencia de producción del mismo.

En primera instancia esta tecnología transferida necesitó de la certificación de la cepa LABIOFAM, según las normas del Centro Nacional de Seguridad Biológica y el Laboratorio Nacional de Referencia de *Leptospira* (LNRL) del IPK. Una vez que fue certificada la cepa nos dimos a la tarea de lograr los mismos resultados obtenidos hasta el momento con el empleo del medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), el cual favorece el crecimiento rápido de este microorganismo, acortando el tiempo de duplicación, además de ser el medio existente en nuestras plantas de producción; así como la introducción del crecimiento agitado, lo cual garantiza mejores condiciones de conservación, mantenimiento y multiplicación celular a fin de lograr lotes con una alta consistencia productiva e ir

instrumentado las regulaciones que impone las entidades regulatorias para este tipo de producto sobre todo en la etapa de multiplicación celular.

A su vez esta nueva variante permitiría comenzar los diferentes diseños del estudio de estabilidad del producto intacto y en uso, ya que en un solo lote se producían cantidades bajas de bulbos que impedían luego evaluar la estabilidad según diseño establecido para diagnosticadores. Además según la transferencia tecnológica la estabilidad de este producto solo había sido medida hasta seis meses, careciendo de valor comercial, según exigencias de comercialización del CECMED.

Teniendo en cuenta esta problemática nos propusimos como objetivo, realizar cambios en esta etapa para obtener la SSE con los medios de cultivos existentes en la actualidad y disponibles en la planta de producción para el óptimo rendimiento del producto, sin afectar la actividad biológica como parámetro fundamental de calidad.

MÉTODOS

Etapas de obtención del antígeno^{4,5}:

1. Multiplicación celular (obtención del inóculo), volumen final 3 000 mL. Duración de toda la etapa=28 días. Etapa que fue evaluada en este estudio.
2. Obtención de la SSE, que incluye solubilización de la membrana y extracción con etanol. Duración de toda la etapa=dos días.

Cepa: Se utilizaron en este estudio dos cepas la *L. biflexa* Patoc I del Instituto Finlay nombrada cepa FINLAY y la *L. biflexa* Patoc I de los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) nombrada cepa LABIOFAM.

Crecimiento: Las condiciones generales para el crecimiento fueron a temperatura de 28-30 °C,⁶ crecimiento en medio Kortof (MK) o medio MEJH según combinación y crecimiento estático o agitado a 130 r.p.m en zaranda,⁶ y según la cepa productora (LABIOFAM o Finlay). Determinándose el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento (μ), para lo cual fue medida la densidad óptica a 400 nm con un espectrofotómetro cada 24 horas durante siete días (tres réplicas por cada combinación). Para la comparación de estas variables entre variantes se utilizó la prueba de ANOVA con un nivel de significación $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Para el diseño experimental se tuvo en cuenta los cambios realizados en las condiciones de crecimiento y la cepa a

utilizar, siendo formados ocho grupos experimentales como resultado de un diseño multifactorial:

Variante 1= Medio MK, cepa LABIOFAM, crecimiento estático (Procedimiento Control, dado en la transferencia tecnológica).

Variante 2= Medio MK, cepa LABIOFAM, crecimiento agitado (130 r.p.m).

Variante 3= Medio MEJH, cepa LABIOFAM, crecimiento estático.

Variante 4= Medio MEJH, cepa LABIOFAM, crecimiento agitado (130 r.p.m).

Variante 5= Medio MK, cepa FINLAY, crecimiento estático.

Variante 6= Medio MK, cepa FINLAY, crecimiento agitado (130 r.p.m).

Variante 7= Medio MEJH, cepa FINLAY, crecimiento estático.

Variante 8= Medio MEJH, cepa FINLAY, crecimiento agitado (130 r.p.m).

Controles internos de calidad del proceso de multiplicación celular: Fueron realizados al término de cada una de las etapas, observándose al microscopio óptico la motilidad de las leptospiras, pureza con tinción simple (libre de contaminantes), y pureza en medio selectivo de cultivo (caldo Tioglicolato, caldo Triptona soya y siembra en placas de agar sangre) según los Procedimientos Normalizados de Operaciones (PNO) 21-275 y 20-085^{4,7}.

Controles de esterilidad: Luego de la titulación de la muestra diluida según título y consistencia de este, se

realizó por parte de la Vicepresidencia de Calidad de nuestro Instituto, el ensayo de esterilidad una vez que fue distribuido el volumen final a razón de 1mL/ bulbo. El método a utilizar fue el indirecto según PNO 14-012. Almacenándose de 2-8 °C⁸⁻¹⁰.

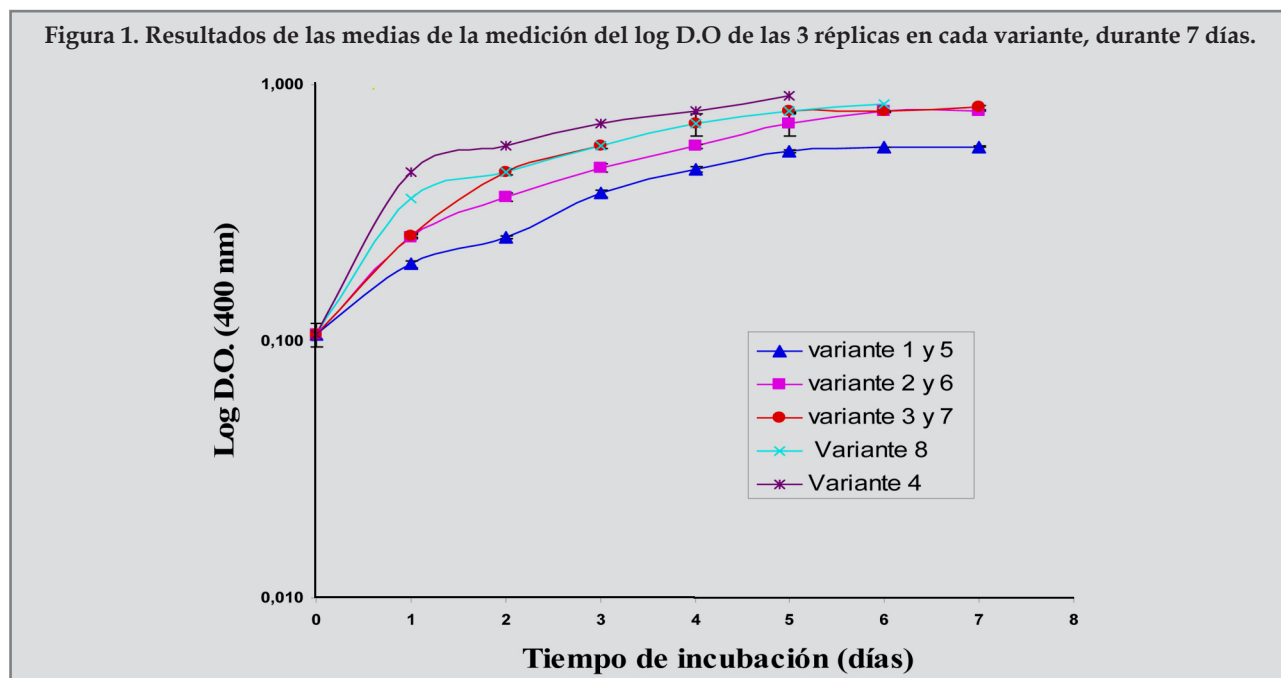
Control de la actividad biológica: Se realizó la titulación de cada combinación de la muestra cruda y diluida frente a 12 sueros positivos de referencia a Leptospirosis del LNRL del IPK. La técnica realizada fue la HAI¹¹⁻¹³.

RESULTADOS

En la figura 1 se observan los resultados del crecimiento de las cepas de leptospiras expuestas a las 8 variantes de tratamiento en función de las diferentes condiciones culturales. La mejor variante de crecimiento fue la cuatro.

Los resultados de la tabla 1 corroboran lo ya comentado sobre el crecimiento, obteniéndose en la variante cuatro un tiempo de duplicación de dos días, siendo 2,15 días menos que en la variante control, siendo estos resultados significativos estadísticamente al ser comparados con el resto de las demás variantes.

Teniendo en cuenta las especificaciones de calidad del proceso tecnológico en la etapa de multiplicación celular (tabla 2), se observa que independientemente del título de anticuerpos detectados por la técnica de HAI con el uso de esta SSE en sus diferentes variantes, todas fueron satisfactorias, al incluir la pureza del medio de cultivo y la esterilidad. En este caso este producto como especificación de calidad no clasifica como producto estéril, solo se establece como producto controlado microbiológicamente,



y todas las variantes pasaron esta prueba, con sus correspondientes informes de calidad.

DISCUSIÓN

Según los resultados del gráfico 1 se puede observar que todos los grupos tuvieron un tiempo de crecimiento entre cinco a ocho días acorde a lo que se reporta en la literatura para este tipo de cepa saprofita^{14,15}.

En la variante de crecimiento cuatro, se obtuvo un log D.O aceptable a partir de los cinco días, permitiendo de esta forma acortar el proceso de escalado en cada de las sub-etapas en las que se divide la etapa de multiplicación celular durante la obtención de este producto. En la variante cuatro se utilizó la cepa LABIOFAM, con lo cual queda demostrado que esta cepa es la que mejor crece bajo diferentes condiciones culturales, dada por las bondades de crecimiento que experimenta. Por otra parte se demostró que el crecimiento agitado sigue siendo el óptimo crecimiento para el desarrollo rápido de microorganismos (m.o) aerobios, ya que favorece la aeración, así como el contacto más íntimo entre el m.o y el sustrato, habiendo menos consumo de energía, a la par que favorece un crecimiento más sincronizado de las células¹⁶.

Este crecimiento del grupo cuatro se obtuvo antes del grupo uno (control), por tanto desde el punto de vista cultural supera el procedimiento tecnológico transferido. La inclusión en esta variante del medio EMJH, también contribuyó a un mejor crecimiento, ya que este medio es el más apropiado y utilizado mundialmente para el crecimiento de cepas de leptospiras saprofitas y patógenas¹⁷⁻¹⁹.

Hemos de destacar que en la variante ocho también se obtuvieron resultados alentadores al utilizar la cepa FINLAY. Aun así la velocidad de crecimiento de esta variante difiere significativamente con la cuarta variante, existiendo marcadas diferencias entre estas, siendo la variante cuatro la óptima. Además la velocidad específica de crecimiento (μ) de cada variante concuerda con los obtenidos por varios autores en el estudio de la dinámica de crecimiento de cepas de *Leptospira* saprofitas y en específico del serovar Patoc I²⁰⁻²⁴.

Debido a un menor tiempo de duplicación de la variante cuatro se obtuvieron los lotes en 15 días, reduciendo el tiempo a la mitad al ser comparado con el tiempo del proceso control. Hecho que por si solo expone las ventajas de este proceso, en cuanto a rapidez, mejor aprovechamiento de los nutrientes y disminución en los gastos de medio de cultivo, de electricidad y de personal. Como resultado final es posible con esta nueva metodología la entrega de la SSE al MINSAP en un menor tiempo, así como un mayor

Tabla 1. Respuestas en porcentaje de la pregunta 1 de la encuesta “¿Cuándo tiene una duda en temas de salud a quien suele preguntar?”.

Variantes	Parámetros de crecimiento		
	Modelo matemático	μ (h ⁻¹)	Td (días)
1 y 5	$y = 0,0725x + 0,1333$	0,16c	4,15
2 y 6	$y = 0,1018x + 0,1504$	0,23b	2,95
3 y 7	$y = 0,1041x + 0,1972$	0,24b	2,89
8	$y = 0,1178x + 0,1929$	0,27b	2,50
4	$y = 0,1458x + 0,2239$	0,33a	2,00

m: Velocidad específica de crecimiento Td: Tiempo de duplicación
Las letras representan los resultados de la comparación estadística obtenidos de la aplicación de la prueba de ANOVA, con un nivel de significación $p < 0,05$. Letras iguales no difieren significativamente, letras diferentes difieren de forma significativa.

número de lote.

Al analizar la actividad biológica del producto crudo como parámetro fundamental de calidad de todo el proceso, se observa que en la variante cuatro nuevamente se obtuvo mayor título de anticuerpos, lo cual permitió una mayor dilución del producto, con un número mayor de frascos por lote de producción. En la variante cuatro se obtuvieron 1197 frascos, que de ser estable el producto por un año con un solo lote de producción es posible suplir la demanda anual de nuestro país, la cual es como promedio de 1100 frascos/año. Además según la variante uno o control solo se obtenían por lote 285 frascos como promedio, siendo un número insuficiente de frascos por lote para realizar los diferentes estudios de estabilidad del producto intacto que incluye el estudio en tiempo real, bajo condiciones aceleradas y bajo condiciones de estrés, además del estudio de estabilidad del producto en uso (una vez reconstituido).

El título de la variante cuatro fue de 1/64, sin embargo el de la variante uno o control fue de 1/16. Esto demuestra que la variante cuatro es capaz de detectar con mayor especificidad los anticuerpos presentes en una muestra problema, induciendo mayor especificidad diagnóstica a esta prueba serológica. Por otra parte en todas las variantes los títulos de la dilución fueron consistentes con los de la muestra cruda, demostrando que bajo nuestras condiciones experimentales el producto se mantuvo estable durante todo el proceso de obtención y es consistente en un 100% al ser manipulado a partir de su forma original.

Hasta el momento no ha sido medido el impacto económico, pero de ser estable el producto a largo plazo (12-18 meses) es evidente la disminución considerable en tiempo, electricidad y otros indicadores económicos. Además de que este estudio permitió medir por primera vez el valor

Tabla 2. Resultados finales de los cambios en la etapa de multiplicación celular de la SSE.

Variantes	Especificaciones de Calidad	Duración total del proceso (días)	Título Inicial	# de frascos a entregar	Título Final
1 (Control)	S	30	1/16	285	1/16
2	S	25	1/16	285	1/16
3	S	23	1/32	589	1/32
4	S	15	1/64	1197	1/64
5	S	30	1/16	285	1/16
6	S	27	1/16	285	1/16
7	S	25	1/32	589	1/32
8	S	23	1/32	589	1/32

S=Satisfactorio, I=Insatisfactorio

económico de este producto, así como el comienzo de los diferentes estudios de estabilidad de la muestra intacta y en uso, útil para su registro.

CONCLUSIÓN

La mejor variante fue la 4 (cepa de LABIOFAM, crecimiento en medio MEJH y agitado a (130 r.p.m), con una disminución considerable en el tiempo de obtención de la SSE mediante esta nueva tecnología, con un título consistente con las exigencias de calidad. Además esta nueva variante permitió entregar un número superior de frascos de la SSE al programa Nacional de Lucha contra la Leptospirosis en el año 2010; al compararla con la tecnología transferida; así como fue posible comenzar los diferentes diseños de estudios de estabilidad del producto intacto y en uso, resultados que avalan su registro.

AGRADECIMIENTOS

El colectivo de autores quisiera agradecer a los trabajadores del Laboratorio Nacional de Referencia de *Leptospira* del Instituto Pedro Kourí (IPK), y al equipo de trabajo de la Planta de Producción número III del Instituto Finlay.

BIBLIOGRAFÍA

1. MINSAP. Ministerio de Salud Pública, Cuba. Programa nacional de prevención y control de la leptospirosis humana. Boletín MINSAP Cuba. 1998; 1:45-48.
2. BES (IPK). Situación de la Leptospirosis. Boletín Epidemiológico Semanal: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". 1991; 1(52):3-4.
3. MINSAP. Ministerio de Salud Pública. Informe del Programa de Zoonosis. La Habana. Boletín MINSAP Cuba. 2008; 4:26-32.
4. Obtención de inóculo de *Leptospira biflexa* serovar Patoc I. Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operaciones. PNO- N.º 21-275/2010 (4 marzo 2009).
5. Obtención del antígeno de *Leptospira biflexa* serovar Patoc I. Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operaciones.

PNO- N.º 21-276/2010 (25 mayo 2009).

6. Cespedes M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. Rev Per Med Exp Salud Pública. 2005; 22(4): 125-157.

7. Requisitos de calidad para pruebas de esterilidad del antígeno de *Leptospira biflexa* serovar Patoc I. Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operaciones. PNO- N.º 20-085/2010 (30 mayo 2010).

8. Dilución y dispensación del diagnosticador de *Leptospira* en humanos. Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operaciones. PNO-N.º 22-040/2010 (30 mayo 2010).

9. Etiquetado y envase de bulbos con diagnosticador de *Leptospira*. Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operaciones. PNO-N.º 23-018/2010 (4 junio 2010).

10. Control de la esterilidad por el método indirecto. Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operaciones. PNO-N.º 14-012/2010 (4 junio 2010).

11. Obregón AM, Martell. M. Diagnóstico serológico de la leptospirosis humana mediante 3 variantes de la técnica de hemoaglutinación pasiva. Rev Cub Med Trop. 1999; 51(1):60-62.

12. Navarro L, González OL, Sánchez ML, Rodríguez O. Comparación de técnicas para el serodiagnóstico de la leptospirosis humana. Rev Cub Invest Bioméd. 2004; 23 Suppl 1:1-15.

13. 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):11-14.

14. Louvel H, Picardeau M. Genetic manipulation of *Leptospira biflexa*. Curr. Protoc. Microbiol. 2007; 12:25-32.

15. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. *Leptospira* and leptonema. Pfaller MA. In: et al, eds. Manual of clinical microbiology, 8th edn. Washington DC: ASM Press; 2003.p.929-936.

16. Perni S, Andrew PW, Shama G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. Food Microbiol. 2005; 22:491-495.

17. Adler B, de la Peña M. *Leptospira* and Leptospirosis. Vet Microbiol. 2009; 30:1010-1016.

18. 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.

19. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiol.* 2008; 154:1309-1317.

20. Bourhy P, Frangeul L, Couve E, Glaser P, Saint Girons I. Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. *J Bacteriol.* 2005; 187:3931-3940.

21. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, 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(2):1607-1616.

22. Louvel H, Bommezzadri S, Zidane N, et al. Comparative and Functional Genomic Analyses of Iron Transport and Regulation in *Leptospira* spp. *J Bacteriol.* 2006; 188(22):7893-7904.

23. Sritharan M, Asuthkar S. Iron regulated proteins (IRPs) of *Leptospira biflexa* serovar Patoc, strain Patoc I. *Indian J Med Microbiol.* 2004; 22(2):92-96.

24. Louvel H, Betton JM, Picardeau M. Heme rescues a two-component system *Leptospira biflexa* mutant. *BMC Microbiol.* 2008; 8:2