

SENSIBILIDAD DE DOS SEROVARIEDADES DE *Leptospira interrogans* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 5-FLUOROURACILO. ^a

Miguel A. Cisneros-Puebla ^b

Nora Rojas-Serranía ^b

Luis P. Moles-Cervantes ^c

RESUMEN.

Uno de los principales problemas en el aislamiento de *Leptospira* a partir de muestras de campo es su alta contaminación por diversos grupos bacterianos, lo cual hace imprescindible el uso de inhibidores, tales como el 5-Fluorouracilo (5-FU). Los reportes en la literatura no son coincidentes respecto a la concentración de 5-FU que se debe utilizar. Con el propósito de facilitar el primoaislamiento de *Leptospira interrogans* y medir la viabilidad de la misma, se intenta definir la concentración adecuada de 5-FU que permita el crecimiento de esta bacteria. Se probaron cantidades crecientes de 5-FU contra dos serovariedades distintas de *Leptospira*, utilizando como medio de cultivo caldo biotriptasa adicionado con suero de conejo, se incubaron a 30C durante 8 días y se resembraron nuevamente en el medio antes mencionado. El crecimiento no se vio afectado al utilizar 0.1 mg/ml para la serovariedad *pomona* y hasta 0.3 mg/ml para la serovariedad *shermani*. Cuando se intenta el primoaislamiento, como se desconoce que serovariedad está involucrada, se recomienda usar concentraciones cercanas a 0.1 mg/ml. de 5-FU

Palabras Clave: *Leptospira interrogans*, leptospirosis, 5 fluorouracilo, *L. pomona*, *L. shermani*.

Tec. Pecu. Méx. Vol. 32 No. 1, (1994)

INTRODUCCION

El diagnóstico de leptospirosis constituye un grave problema debido a la gran diversidad de los datos clínicos que se observan, por lo cual es indispensable la detección de anticuerpos circulantes o bien, el aislamiento del microorganismo (1).

Si se muestrean individuos que se sospecha hayan quedado como portadores asintomáticos, se puede intentar el aislamiento a partir de orina y semen; cuando se trata de cadáveres la recomendación es tomar muestras de riñón y orina (1, 2, 3).

La contaminación de los materiales clíni-

cos utilizados para el aislamiento, constituye una limitante para el éxito de los mismos. Por esta razón es necesario utilizar un medio de cultivo selectivo adicionado con inhibidores bacterianos que no afecten el crecimiento de la *Leptospira*, lo que resulta de gran utilidad para realizar el primoaislamiento de la *Leptospira* (1). Además en el laboratorio, durante el manejo rutinario de los cultivos de cepas de referencia y sus resiembras, siempre existe el riesgo de contaminación, por lo que es importante contar con técnicas en base al uso de inhibidores de crecimiento bacteriano indeseable, para volver a purificar estos cultivos.

Existen varias sustancias que en bajas concentraciones no afectan significativamente el crecimiento de esta bacteria y si inhiben el crecimiento de otros microorganismos, tales como sulfato de neomicina, sulfadiazina, sulfaguanidina, ciclohexamida, rifampicina y el 5 - fluorouracilo (5-FU) (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). En el caso

^a Recibido para su publicación el 10. de febrero de 1993.

^b UAM-Xochimilco, Depto. de Producción Agrícola y Animal, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quetzal, Coyoacán, México, D.F. C.P. 16000, 724-52-10 y 724-52-27.

^c CENID-Microbiología. INIFAP-SARH. Km 15.5, Carretera México-Toluca, Cuajimalpa, D.F., C.P.05110. FAX 570-40-73.

del 5-FU las concentraciones recomendadas van desde 0.1 mg hasta 0.5 mg/ml (5, 6, 7, 9), aún cuando los resultados reportados son muy diversos y no coincidentes. En el presente trabajo el objetivo es definir la concentración adecuada de 5-FU que debe contener el medio de cultivo para que actúe como inhibidor de la contaminación bacteriana, sin que se vea afectado el crecimiento de *Leptospira interrogans* serovariedades *pomona* y *shermani*.

MATERIALES Y METODOS

El medio de cultivo utilizado fue caldo biotriptasa adicionado con el 10% de suero estéril de conejo (1), y 5-FU en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/ml para cada uno de los cultivos experimentales y un control carente de 5-FU.

Se probaron las serovariedades de *Leptospira interrogans*: *shermani* cepa Lt821 y *pomona* cepa *Pomona*.

El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de 5-FU. A partir de

cada tubo de cultivo se hicieron resiembras por triplicado. Todos los tubos fueron incubados a 30C durante 8 días y fueron observados en un microscopio de campo obscuro. Se efectuó un conteo celular para los cultivos primarios con una cámara de Petroff-Hausser. Para las resiembras fue considerado un criterio numérico del 1 al 4 dependiendo de la densidad observada de células por campo (1).

Los estadísticos de prueba utilizados para el análisis de los resultados fueron: Regresión lineal simple; análisis de varianza por una vía de clasificación y comparación de medias (S.N.K.).

RESULTADOS

En los resultados de la cuenta celular, realizada en la cámara de Petroff-Hausser de los cultivos experimentales adicionados con el 5-FU, así como de los cultivos controles para ambas serovariedades de *Leptospira*, se observa una disminución conforme aumenta la concentración del

CUADRO 1. DATOS EXPERIMENTALES, LECTURA A LOS 8 DÍAS DE INCUBACION POR CUENTA CELULAR EN LA CAMARA DE PETROFF-HAUSER. PARA EL TRATAMIENTO ESTADISTICO LOS DATOS FUERON TRANSFORMADOS A LOGARITMO EN BASE 10.

Leptospira interrogans shermani

5-FU mg/ml	TUBOS DE CULTIVO		
	A	B	C
0.0	5.6×10^9	4.8×10^9	4.9×10^9
0.1	4.3×10^9	4.4×10^9	4.8×10^9
0.2	4.4×10^9	4.2×10^9	4.6×10^9
0.3	4.4×10^9	5.2×10^9	4.4×10^9
0.4	3.1×10^9	3.6×10^9	3.4×10^9
0.5	3.9×10^9	3.2×10^9	3.6×10^9

Leptospira interrogans pomona

5-FU mg / ml	TUBOS DE CULTIVO		
	A	B	C
0.0	1.9×10^9	2.1×10^9	2.4×10^9
0.1	2.1×10^9	2.7×10^9	3.1×10^9
0.2	9.0×10^8	1.0×10^9	9.0×10^8
0.3	1.1×10^9	9.0×10^8	9.0×10^8
0.4	5.0×10^8	7.0×10^8	6.0×10^8
0.5	3.5×10^7	5.0×10^7	4.5×10^7

CUADRO 2. ANALISIS DE VARIANZA POR UNA VIA DE CLASIFICACION Y COMPARACION DE MEDIAS.

ANOVA para el conteo celular de *Leptospira interrogans shermani*:

ORIGEN DE LA VARIACION	gl	SS	MS	F	F crit.* α 0.01 (5; 12)
TRATAMIENTO	5	0.07	0.014	16.86	5.06
ERROR	12	0.01	0.00083		
TOTAL	17				

* F > F crit. rechaza Ho que son iguales.

Comparación de medias (SNK) para *Leptospira interrogans shermani*:

5-FU	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.0	-					
0.1	N	-				
0.2	N	N	-			
0.3	N	N	N	-		
0.4	S	S	S	S	-	
0.5	S	S	S	S	N	-

N = No significativa

S = Significativa

inhibidor (cuadro 1).

En los resultados (gráficas 1 y 2) se observa una disminución del crecimiento de la *Leptospira* conforme se aumenta la concentración del 5-FU.

El análisis estadístico reveló que para *L. pomona* no hubo diferencias significativas entre el grupo control y los cultivos adicionados con 0.1 mg/ml del 5-FU (cuadro 3), mientras que para *L. shermani* no se detectaron diferencias significativas hasta 0.3 mg/ml. (cuadro 2).

El comportamiento de las resiembras fué similar al observado en los cultivos primarios.

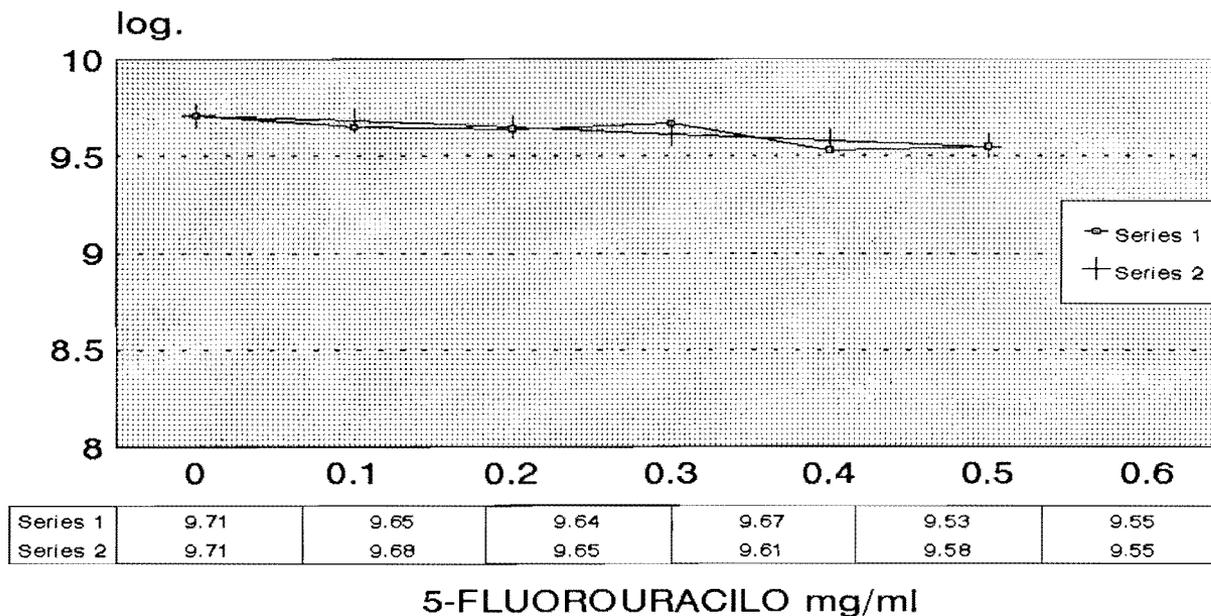
DISCUSION

Las diferencias en el crecimiento entre las serovariedades *pomona* y *shermani* en medios con diferentes concentraciones de 5-FU, quizás se debe a las particularidades fisiológicas de las distintas serovariedades de la especie *interrogans*. Este

hecho es también observado en condiciones normales, en el tiempo de crecimiento bacteriano, la capacidad de adaptación a diferentes medios, así como la sensibilidad selectiva ante distintos agentes como son el complemento y los antimicrobianos que presentan las diferentes serovariedades (2, 4).

En la literatura se reporta el uso de concentraciones de 5-FU tan altas como 0.5 mg/ml; sin embargo, de acuerdo a estos resultados, se concluye que el éxito en el uso de diferentes concentraciones de 5-FU, como agente reductor de contaminación para el aislamiento de *Leptospira* dependerá de la serovariedad involucrada. Por otra parte, en el manejo de materiales clínicos para el primoaislamiento, se recomienda usar concentraciones de 5-FU cercanas a 0.1 mg/ml, puesto que por lo general se desconoce la serovariedad que se intenta aislar.

Gráfica I. CULTIVOS ADICIONADOS CON 5-FU shermani

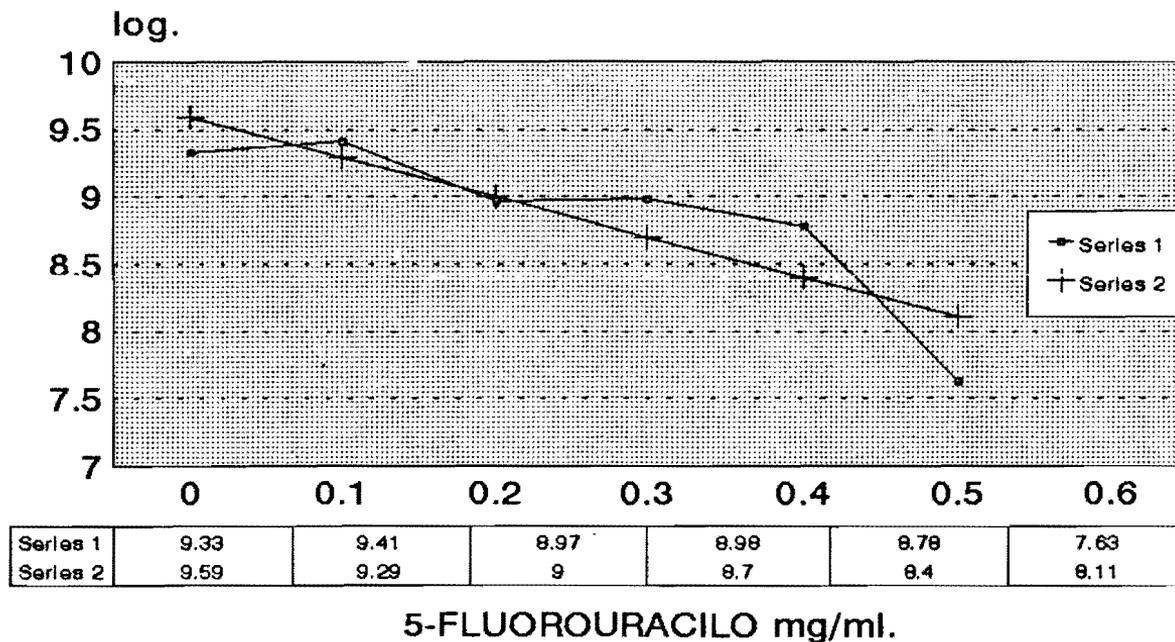


REGRESION LINEAL

Serie 1. Promedio de valores observados

Serie 2. Valores calculados

Gráfica II. CULTIVOS ADICIONADOS CON 5-FU pomona



REGRESION LINEAL

Serie 1. Promedio de valores observados

Serie 2. Valores calculados

CUADRO 3. ANALISIS DE VARIANZA POR UNA VIA DE CLASIFICACION Y COMPARACION DE MEDIAS.

Anova para el conteo celular de *Leptospira interrogans pomona*:

ORIGEN DE LA VARIACION	gl	SS	MS	F	F crit. * α 0.01 (5, 12)
TRATAMIENTO	5	6.21	1.242	295.71	5.06
ERROR	12	0.05	0.0042		
TOTAL	17				

* $F > F$ crit. rechaza H_0 que son iguales.

Comparación de medias (SNK) para *Leptospira interrogans pomona*:

5-FU	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.0	-					
0.1	N	-				
0.2	S	S	-			
0.3	S	S	N	-		
0.4	S	S	S	S	-	
0.5	S	S	S	S	S	-

N = No significativa

S = Significativa

Cuando en el Laboratorio ocurra contaminación accidental de los cultivos, también será recomendable el uso de 5-FU en la misma concentración como rutina, ya que el uso de concentraciones más altas dependerá de la cantidad y tipo de los contaminantes, así como de la serovariedad involucrada, ya que el 5-FU se metaboliza y se agota en el medio.

SUMMARY

One of the main problems involved in *Leptospira* isolation is bacterial contamination, which can be prevented by inhibitors such as 5-fluorouracile (5-FU). Due to the different amounts of 5-FU usually recommended it was decided to establish a concentration of 5-FU for inhibition bacterial growth without affecting the viability of *Leptospira interrogans*. It was found that concentrations up to 0.1 mg/ml of 5-FU did not affect the growth of serovar *pomona* and concentrations up to 0.3 mg/ml of 5-FU, did not affect the growth of serovar *shermani*. According to these data and due to the fact that usually the serovar is not known when prime isolation is attempted, no more than 0.1 mg/ml of 5-FU in the culture media is recommended.

Key words: *Leptospira interrogans*; leptospirosis; 5-Fluorouracile; *L. pomona*; *L. shermani*.

REFERENCIAS

1. Myers D M. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Nota técnica 30, Argentina. Centro Panamericano Zoonosis, OPS, 1985:10.
2. Ellis W A, McParland P J, Bryson D G, McNulty M S. Leptospire in pig urogenital tracts and fetuses. Vet. Rec. 1985; 117 (3) 66.
3. Wierzbowski S. Principles of veterinary prevention dictated by the risk of infection associated with handling isolated genetic material. Med. Weter. 1987; 43(6) 363.
4. Cisneros P MA, Salomón S A, Benavides P L, Moles C LP. Efecto sobre el crecimiento de *Leptospira* por la adición de un diluyente de semen porcino al medio de cultivo. En: XXIV Congreso nacional de AMVEC. Michoacán. 1989: 304.
5. Ellis W A, Songer J G, Montgomery J, Cassells J A. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in genital and urinary tracts of non pregnant cattle. Vet. Rec. 1986; 118 (1) 11.
6. Ellis W A, Thiermann A B. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* from sows in Iowa. Am. J. Vet. Res. 1986; 47 (7) 1458.
7. Shotts E B. Laboratory diagnosis of leptospirosis. In: Johnson R C (ed.) The biology of parasitic spirochetes. Nueva York: Academic Press, 1976: 209-223.
8. Kingscote B F. Leptospirosis outbreak in a piggery in Southern Alberta. Can. Vet. J. 1986; 27(4) 188.

9. López C, Pérez B, Rivas L, Beades M, Dumas S. Estudio comparativo de medios selectivos para el aislamiento de *Leptospira*, informe preliminar. En: Finlay C J (ed.) Quinto evento científico. La Habana, Cuba. 1987: s/p.
10. Shopet R, Marshall R B. An experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira ballum* from mice to cats. Br. Vet. J. 1980; 136 (3) 265.