

Evaluación de la patogenia y crecimiento de cepas aisladas de *Leptospira* en los departamentos de León y Chinandega, Nicaragua.

Pathogenesis and growth evaluation of *Leptospira* strains isolated from León and Chinandega departments, Nicaragua.

Batista Santiesteban, N ¹; Arencibia Arrebola, D.F ¹; Blain Torres, K ¹; Rosario Fernández, L.A ²; Jirón Toruño, W ³; Duttman, Ch ³; Solís Rodríguez, R.L ¹.

¹ Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

² Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

³ Escuela de Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), León, Nicaragua.

Correspondencia a: Niurka Batista Santiesteban. **Teléfono:** 057(07)2716911. **Email:** nbatista@finlay.edu.cu

Resumen: El siguiente trabajo se desarrollo con el objetivo de evaluar el grado de virulencia de aislamientos clínicos procedentes de los departamentos de León y Chinandega, cinética de crecimiento bajo condiciones de cultivo agitado y número de dosis letal media necesaria para provocar infección letal en el modelo animal hámster sirio. Se analizaron muestras de hemocultivos tomadas en fase aguda de casos con sospecha clínica de leptospirosis. Todas las muestras fueron inoculadas en hámster para estimar el grado de virulencia. Las muestras que resultaron altamente virulentas fueron inoculadas nuevamente en hámster por el método de Fajardo y col para determinar el número de dosis letales media y luego subcultivadas en medio líquido para realizar el estudio de la cinética de crecimiento. La inoculación en el modelo animal permitió identificar un número de aislamientos virulentos y no virulentos. La dosis letal media de los aislamientos virulentos oscilo entre 32 y 4 células aproximadamente. La cinética de crecimiento estuvo en correspondencia con los patrones de crecimiento que se describen para este tipo de microorganismo. Los resultados del presente estudio sugieren que en los departamentos de León y Chinandega circulan cepas de *L. interrogans* más estables y menos estables en cuanto a la virulencia, independientemente del serovar circulante.

Palabras clave: Leptospirosis, patogenia, virulencia, Nicaragua, cinética de crecimiento.

Abstract: The aim of this work was evaluating the degree of virulence of clinical isolations coming from the León and Chinandega departments, kinetics of growth under agitated culture conditions and number of medium lethal dose required to cause lethal infection in the animal model Syrian hamster. Samples from blood cultures taken in acute cases with clinical suspicion of leptospirosis. All samples were inoculated in hamster to estimate the degree of virulence. The samples that were highly virulent in hamsters were inoculated again by the method of Fajardo et al to determine the number of lethal doses medium and then subcultured in liquid medium for studying the growth kinetics. The inoculation in the animal model identified a number of virulent and avirulent isolates. The median lethal dose of virulent isolates ranged between approximately 32 and 4 cells. The kinetics of growth was in line with the growth patterns described for this type of microorganism. The results of this study suggest that in the Leon and Chinandega departments circulating strains of *L. interrogans* more stable and less stable in terms of virulence, regardless of the serovar circulating.

Key words: Leptospirosis, pathogenesis, virulence, Nicaragua, growth kinetics.

Como citar este artículo: Batista N, Arencibia D.F, Blain K, Rosario L.A, Jirón W, Duttman Ch, Solís R.L. Vet. Arg. 2010; 27(266):1-8.

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por *Leptospiras* patógenas que son transmitidas directamente o indirectamente a humanos y animales. Esta enfermedad tiene amplia distribución mundial, pero es comúnmente más asociada con áreas tropicales y subtropicales (1). La exposición a *Leptospira* puede asociarse con deportes acuáticos, exposición esporádica en áreas urbanas de países en desarrollo, brotes asociados con estaciones de lluvias e inundaciones en áreas urbanas con deficientes condiciones sanitarias y ocurre como una enfermedad endémica en áreas rurales de América Latina y el sureste de Asia (2-4).

Durante los meses de octubre-noviembre del 2007, Nicaragua sufrió severas inundaciones provocadas por lluvias constantes, causadas por el huracán Félix, que condujeron al desarrollo de brotes de leptospirosis fundamentalmente en los Departamentos de León y Chinandega. De este brote se aislaron 16 cepas de *Leptospira* de pacientes con evidencia epidemiológica, serológica y sintomatología característica de Leptospirosis. Las graves pérdidas económicas y humanas causadas por esta enfermedad justifican el uso de vacunas profilácticas en poblaciones humanas y animales bajo riesgo de infección (5). Previo a la utilización de estas cepas con fines vacunales para su uso en humanos, resulta imprescindible una adecuada selección y caracterización microbiológica de las mismas.

Este trabajo se desarrollo con el objetivo de caracterizar el crecimiento y la virulencia de cepas aisladas de *Leptospira* en los departamentos de León y Chinandega.

Materiales y métodos

Bacteria: Se utilizaron en el estudio 5 cepas procedentes de pacientes con evidencias clínicas, serológicas y epidemiológicas de la enfermedad leptospirósica del brote ocurrido en los departamentos de León y Chinandega, la parte más noroccidental de Nicaragua (tabla 1). Se incluyó además, la cepa vacunal *L. interrogans* serovar *Canicola*, la cual fue originalmente aislada a partir de muestras animales remitidas al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana, Cuba. Todas las cepas fueron cultivadas en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (6) a 28°C e inoculadas en hámster para determinar su grado de virulencia. Las cepas virulentas fueron almacenadas a -70°C, en nitrógeno líquido y en medio semisólido de Fletcher (7) hasta su posterior utilización.

Tabla 1. Cepas empleadas en el estudio.

Serogrupo	Cepa	Procedencia
Serjoe	7407	León
Pomona	6307	Chinandega
Serjoe	4207	Chinandega
Ballum	8807	Chinandega
Icteroahemorrhagiae	3507	León

Evaluación del crecimiento: La cinética de crecimiento, de cada uno de los aislamientos fue estimada en medio EMJH en condiciones de agitación a 130 rpm y 28°C. Cada evaluación se realizó por triplicado y se incorporó como control de crecimiento la cepa vacunal *L. interrogans* serovar *Canicola*. Se determinó la curva de crecimiento con los valores promedios, en cada caso tomando muestras de los cultivos cada 24 h durante 7 días. La concentración microbiana de cada muestra fue estimada mediante espectrofotometría ($\lambda=400$ nm) y conteo directo de células en cámara de Petroff-Hausser. En cada muestreo se evaluaron características culturales como motilidad y uniformidad celular por observación bajo el microscopio de campo oscuro y se realizaron controles de pureza a los cultivos mediante tinción de Gram y siembra en caldo triptonsoya y caldo tioglicolato. Fueron analizados parámetros del crecimiento microbiano como la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (Td).

Evaluación de la patogenicidad de la enfermedad: Se inocularon 50 Hámster por vía intraperitoneal 1mL del cultivo de cada una de las cepas en fase exponencial teniendo una concentración celular de 7.5×10^6 leptospira/mL (10 animales por cepa), evaluándose signos de la enfermedad y mortalidad durante 14 días. Se consideró como criterio de aceptación que las cepas desarrollaran la infección leptospirósica y/o logaran el 100% de mortalidad en ese período (8). La observación clínica se realizó diariamente durante 14 días post-inoculación para evaluar la aparición de signos clínicos como pilo erección, excitabilidad, íctero de piel y mucosas, hemorragias a través de los orificios naturales, postración y muerte. Para el análisis estadístico de la frecuencia de los signos clínicos y las lesiones anatomopatológicas observadas, se aplicó la prueba de análisis de las medias – proporciones binomiales y el reporte del Análisis de las Medias (ANOVA) usando el paquete estadístico Statgraphics plus 5.0. Se utilizó un coeficiente de significación estadístico de 0.05 para todas las comparaciones.

Estimación de la virulencia: Para la evaluación de la virulencia, se emplearon hámster machos (n=2 en cada grupo) de aproximadamente 45 a 50g de peso, los cuales fueron infectados intraperitonealmente con 0.8, 0.4, 0.1 y 0.05 mL de una suspensión bacteriana de cada aislamiento ajustada ajustado a 7.5×10^6 leptospira/mL (por conteo directo en cámara de Petroff-Hauser), proveniente de un cultivo estático de 5-6 días en medio EMJH. Los animales fueron observados durante 14 días posinoculación. Se consideró cepa altamente virulenta aquella que produjo la muerte de al menos todos los animales inoculados con 0.8-0.1mL de la suspensión bacteriana. Con menores niveles de letalidad la cepa fue considerada de virulencia moderada o baja. Las cepas que no causaron la enfermedad letal fueron consideradas como avirulentas. Solamente las cepas altamente virulentas fueron empleadas en el estudio de dosis letal media (LD₅₀).

Dosis letal media en hámster: Se estudió la dosis letal media según la metodología propuesta por Fajardo y otros (9). Se utilizaron en el estudio animales de 45-50g de peso, mantenidos bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad relativa. Los animales fueron observados hasta 14 días luego de la infección. El cálculo de la DL₅₀ para cada cepa fue realizado mediante el método de Reed y Muench (10). Se emplearon animales inoculados con medio líquido EMJH como control negativo y se realizó la evaluación de la dosis letal media en tres momentos diferentes con distintos lotes de animales.

Estudios anatomopatológicos: En todos los experimentos se realizaron estudios anatomopatológicos por métodos convencionales, utilizando la técnica descrita por Castillo (11) para la necropsia, realizando la observación macroscópica de los órganos "in situs" y tomándose muestras para los estudios histopatológicos de los tejidos que se consideraron, los que fueron fijados en formol neutro al 10%, para tinción con Hematoxilina-Eosina y Warthyn Starry (12). Tanto los signos clínicos como las alteraciones macroscópicas y descripciones microscópicas fueron recogidos en protocolos establecidos al efecto.

Resultados

Cinética de crecimiento: Partiendo de una misma concentración inicial, de las cepas 3507, 4207, 6307, 7407 y 8807, se observó que los valores de concentración celular alcanzados fueron inferiores a los obtenidos por la cepa *L. interrogans* serovar *Canicola*, tras finalizar la fase exponencial de crecimiento bajo condiciones de cultivo agitado (ver Fig.1). Con estas mismas condiciones de cultivo las cepas *L. interrogans* serovar *Canicola* y 7407 mostraron la misma velocidad específica de crecimiento $1,2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$; mientras que las cepas 3507, 4207, 6307 y 8807, alcanzaron valores de 9,1; 8,5; 8,4; $7,4 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. El tiempo de duplicación de 3507, 4207, 6307 y 8807 fue superior con respecto a la cepa *L. interrogans* serovar *Canicola* y 7407.

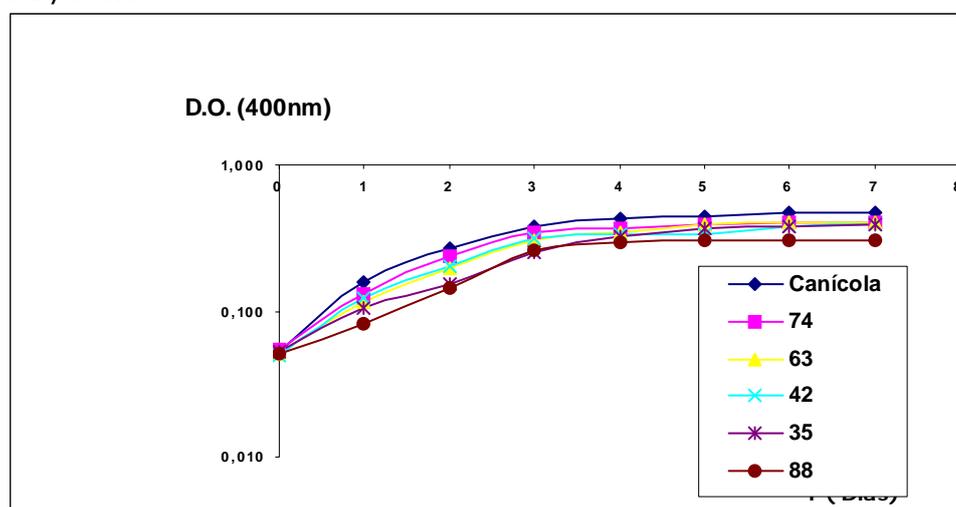


Figura 1- Cinéticas de crecimiento de las cepas L-35, L-42, L-63, L-74, y L-88 usando como control la cepa *L. interrogans* serovar *Canicola* en medio MEJH en condiciones de cultivo agitado.

Evaluación de la patogenia de la enfermedad: Todas las cepas resultaron ser patógenas, ya que las mismas mostraron un cuadro tanto clínico (pilo erección, excitabilidad, signos nerviosos, hemorragias por los orificios nasales, postración) (figuras 2 y 3) como lesional (íctero, grave congestión en todos los órganos, hemorragias pulmonares focales, entre otros) muy florido, característico de la infección experimental. Además causaron la muerte del 100 % de los animales entre el tercer y décimo día post-infección.



Figura 2- Hámsters infectados con *Leptospiras* mostrando signos nerviosos, hemorragias por los orificios nasales y muerte.



Figura 3- Hámsters infectados con *Leptospiras* mostrando íctero y hemorragias pulmonares focales.

Se pudo observar que la frecuencia de la aparición de los signos estudiados fue variable entre las diferentes cepas evaluadas (tabla 2). La piloerección fue un signo clínico generalizado en la mayoría de las cepas, exceptuando la cepa 3507 (Serogrupo *Icterohaemorrhagiae*) la cual difirió ($p < 0.05$) del resto de las cepas con una menor frecuencia de aparición. Este signo está asociado al establecimiento de la fase leptospirémica de la enfermedad y a los picos de fiebre bifásicos (12). Igualmente la excitabilidad es un signo que por lo general se manifiesta cuando aparecen estos picos de fiebre y comienza los daños a nivel de sistema nervioso central (12). La leptospirosis puede presentarse de forma ictérica o anictérica, lo cual está dado entre otros factores por las características propias de cada cepa (4, 13). En este estudio sólo el serogrupo Serjoe (cepas 4207 y 7407) se comportó de forma anictérica en el biomodelo animal. A pesar de que en la etiopatogénea de la leptospirosis se describe y es conocido que ella provoca ruptura del endotelio vascular (14, 15), no se encontraron, en todos los casos, evidencias de la ocurrencia de hemorragias a través de los orificios naturales, lo cual fue evidente para las cepas 3507, 4207 y 7407 ($p < 0.05$) pues parece ser que cuando la enfermedad transcurre de forma muy aguda, de 3 a 5 días, es más visible este evento que cuando transcurren más de 7 días.

Tabla 2-. Signos clínicos observados en los animales controles retados con las diferentes cepas de *Leptospiras virulentas* en estudio.

Cepa	SIGNOS CLÍNICOS					
	Piloerección	Excitabilidad	Ictero piel y mucosas	Hemorragias orificios naturales	Postración	Muerte
3507	4*	3	9	1*	9	10
4207	9	6	0*	0*	10	10
6307	10	10	10	10	10	10
7407	9	6	0*	0*	10	10
8807	10	9	10	10	10	10

* diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) por columnas

Estimación de la virulencia: Las cepas 3507, 4207, 6307, 7407 y 8807 produjeron infección letal en los hámsteres, causando la muerte de los mismos entre el 5to y 7mo día post inoculación para todas las dosis aplicadas. Por lo que fueron consideradas altamente virulentas ya que produjo la muerte de todos los animales inoculados con las dosis $\leq 0.1\text{mL}$ de la suspensión bacteriana.

Dosis letal media en hámsteres: En la tabla 3 se muestran los valores de $DL_{50}\%$ estimados individuales y promedio para cada una de las cepas evaluadas. Como se puede observar las cepas 7407, 6307 y 8807 necesitaron inóculos que contenían entre 30 y 35 leptospiras para producir la infección y posteriormente la muerte de los animales inoculados, mientras que las cepas 4207 y 3507 necesitaron solamente inóculos por debajo de las 7 leptospiras. En todos los casos, los signos clínicos pudieron ser observados a partir del quinto hasta el décimo día post-inoculación y el periodo medio de las muertes en los animales fue de 9 días post-inoculación. Como se aprecia además, la DL_{50} mostró, de manera general, poca variabilidad entre ensayos para una misma cepa.

Tabla 3. Valores de $DL_{50}\%$ alcanzados en el estudio.

Cepas	Valores de DL_{50} de los experimentos individuales			Valores promedios de la DL_{50} (\pm SD)
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
7407	32,1	30,0	31,5	31,2 (1,08)
6307	30,2	29,8	32,0	30,6 (1,17)
4207	4,3	3,2	4,5	4,0 (0,70)
3507	5,2	4,2	6,2	5,2 (1,00)
8807	28,3	0,2	32,4	30,3 (2,05)

SD: Desviación Estándar

Estudios anatomopatológicos: Desde el punto de vista anatomopatológico macroscópico se constataron evidencias inequívocas del establecimiento de la enfermedad, así como graves daños en vísceras y órganos. Las cepas 8807 (serogrupo Ballum) y 6307 (serogrupo Pomona) produjeron focos de hemorragias específicamente en el riñón y pulmones (figura 4 y 5). De forma similar ocurrió una congestión hepática y renal, mientras que la hemorragia renal fue observada con mayor frecuencia en la cepa 6307 (serogrupo Pomona) diferenciándose del resto de las cepas que mostraron esta lesión con menos frecuencia. Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos comúnmente para cepas de leptospira altamente virulentas.



Figura 4-. Corazón y Pulmones de hámsteres infectados con el serogrupo Ballum mostrando grave congestión de corazón y pulmones con enfisema y focos hemorrágicos.



Figura 5-. Hámster infectado con leptospira serogrupo Pomona, mostrando grave congestión renal y focos hemorrágicos en los pulmones.

Histológicamente el hígado, el riñón y los pulmones resultaron ser los órganos más afectados, caracterizados el primero por grave congestión y desorganización de los cordones de hepatocitos con focos hemorrágicos y necróticos en los estados más avanzados. En los riñones se encontró una degeneración grave del epitelio tubular, las hemorragias y los depósitos proteínicos a nivel de los glomérulos y túmulos (figura 6). Mientras que los pulmones se caracterizaron por la presencia de enfisemas, graves congestiones y hemorragias, unido a la presencia de pilomorfos nucleares neutrófilos en los septos alveolares.

La presencia de leptospiras identificadas en la totalidad de los órganos investigados por la técnica argéntica de Warthyn Starryn resultó ser una evidencia inequívoca de la circulación e invasividad de las espiroquetas en los animales infectados (figura 7). Los cuadros lesionales más floridos y con mayor número de leptospiras demostradas con esta técnica correspondieron a los serogrupos Ballum y Pomona; no obstante, en todos los animales infectados pudieron observarse las lesiones y los gérmenes en diferentes órganos. Otros órganos que presentaron lesiones fueron el corazón, con graves hemorragias e infartos agudos, y el SNC que se observó congestivo a nivel de los vasos meníngeos. Por otra parte, en el bazo se destacó la congestión de los cordones y depósito de hemosiderina libre y fagocitada.

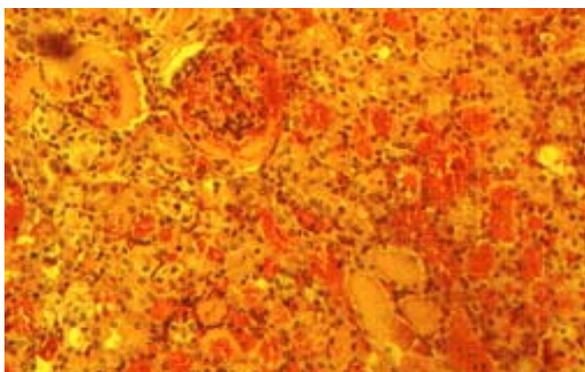


Figura 6-. Corte histopatológico de riñón mostrando grave congestión, degeneración del epitelio tubular, hemorragias y depósitos proteínicos a nivel de los glomérulos. HE x 120.

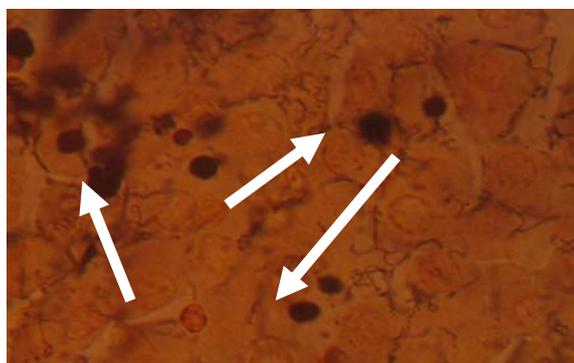


Figura 7-. Corte histopatológico de Hígado mostrando conglomerados de leptospiriosis (fechas). Tinción especial de Warthyn Starryn x 260.

Discusión

Fue analizada la cinética de crecimiento desarrollada por estas cinco cepas tras el cultivo en el medio EMJH, bajo las condiciones de cultivo agitado. Partiendo de una misma concentración inicial aproximada de 5×10^7 células/mL y utilizando como inóculo un cultivo joven con buenas características culturales crecido bajo las mismas condiciones, se observó que la cepa 8807 alcanzó la mitad de los rendimientos logrados por la cepa *L. interrogans* serovar *Canicola* tras finalizar la fase exponencial de crecimiento lo cual sugiere una tasa metabólica inferior (figura 1). Sin embargo la cepa 7407 mostró una velocidad específica de crecimiento igual a la cepa control empleada en el estudio.

Estos resultados fueron similares al evaluar la cinética de crecimiento por tres veces consecutivas. Para todas las cepas evaluadas se pudo apreciar el crecimiento de manera exponencial después del segundo día de incubación. Un aspecto de particular interés en todas las cepas estudiadas, fue las notables características culturales alcanzadas. A pesar de que los rendimientos celulares no superaron a la cepa empleada como control, los resultados sugieren que las cinco cepas clínicas, que no habían sido cultivadas *in vitro* con anterioridad al presente estudio, fueron adaptando paulatinamente su maquinaria metabólica a las nuevas condiciones nutricionales suministradas en el laboratorio, logrando una mejor asimilación de los nutrientes del medio de cultivo tras sucesivos subcultivos.

Cuando la enfermedad se presenta en su forma natural, tanto en el hombre como en los animales domésticos y salvajes el período de incubación oscila entre 7 y 12 días (3, 12), sin embargo, cuando se realizan infecciones experimentales, estos se acortan de 3 a 5 días (16, 17). Estos resultados concuerdan con las observaciones encontradas en la mayoría de las cepas virulentas evaluadas en este estudio en el biomodelo Hámster Sirio, que es susceptible a la enfermedad. Se utilizó la vía intraperitoneal, que facilita una rápida incorporación de las leptospiras al torrente sanguíneo del animal (12, 18) y se emplearon cargas bacterianas altas. Lógicamente, la patogenia de la enfermedad sería más "demorada" si la infección fuese por vías naturales y con cargas bacterianas menores.

Desde el punto de vista anatomopatológico macroscópico, predominó la presencia de cuadros congestivos y hemorrágicos en todos los órganos y sistemas, la presencia de íctero tanto en piel como en mucosas se evidenció en la mayoría de las cepas, con excepción del serogrupo *Serjoe* al comportarse de forma anictérica. El análisis microscópico corroboró el hallazgo general y constante de la presencia de procesos congestivos y hemorrágicos junto a lesiones propias de caquexia (degeneraciones mucoides renales y cardíacas y agotamiento esplénico).

Todo lo cual coincide con las lesiones más comunes descritas en las especies animales infectadas natural o artificialmente por este germen (12, 19). Los hallazgos histológicos encontrados en hígado, riñón y los pulmones son similares a los encontrados en animales y el hombre (20-22) y coincide además con los encontrados en las personas contagiadas con leptospirosis en diferentes brotes epidemiológicos en Nicaragua (1, 23) donde fueron aisladas numerosas cepas dentro de las cuales se encuentra las usadas en este trabajo.

Contar con aislamientos de cepas pertenecientes a serovares candidatos vacunales, caracterizados por una alta virulencia, representativos de los serogrupos que estén circulando en una región determinada, simplificaría gradualmente la confección de una vacuna antileptospirósica hecha a la medida (3, 24). Por tanto una evaluación más completa de la capacidad de candidatos vacunales para inducir una respuesta inmunoprotectora requiere un panel bien caracterizado de cepas virulentas que representen los serovares de importancia tanto desde el punto de vista clínico como veterinario (1).

Numerosos estudios demuestran diferencias sustanciales en la expresión de antígenos importantes en la patogénesis de la enfermedad leptospirósica entre cepas isogénicas virulentas y avirulentas. Proteínas extracelulares, lipoproteínas de membrana externa y adhesinas, son expresadas mayormente por cepas virulentas que por sus variantes 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, de ahí la vital importancia de que las cepas candidatas vacunales muestren una elevada virulencia en los modelos animales (3, 25).

Bibliografía

1. SILVA E, SANTOS CS, ATANASIO DA, SEYFFERT N, SEIXAS FK, CERQUEIRA GM. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 2008; 26:3892–3896.
2. FAINE SB, ADLER B, BOLIN C, PEROLAT P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci; 1999.p.24-26.
3. LEVETT PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):296-326.
4. VINETZ JM. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14(5):527-538.
5. GONZÁLEZ A, RODRÍGUEZ Y, BATISTA N, VALDÉS Y, NÚÑEZ JF, MIRABAL M, GONZÁLEZ M. Inmunogenicidad y capacidad protectora en hámsters de vacunas antileptospirósicas monovalentes de células enteras del serogrupo Ballum. *Rev Argentina Microbiol* 2005; 37:169-175.
6. ELLINGHAUSEN HC, WG MCCULLOUGH. 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.
7. FLECHER W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1928; 21:265-282.
8. 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):32-36.
9. FAJARDO EM, ORTIZ B, CHÁVEZ A, GAINZA N, IZQUIERDO L, HERNÁNDEZ Y. Estandarización de la dosis letal 50 de las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50(1):22-26.
10. REED LJ, MUENCH HA. Simple method of determining fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27:494-497.
11. CASTILLO F. El ratón como animal de laboratorio. La Habana: Ed. Ciencias Médicas 1985; 212:15-18.
12. OLIVA R, INFANTE JF, GONZÁLEZ M, GONZÁLEZ I, FARIÑAS M. Comparación clínico-patológica de la leptospirosis en Hámster Sirio o Dorado y el curiel Duncan Hartley mediante la infección experimental con tres serovares de *L. interrogans*. *VacciMonitor* 1998; 7(5):8-13.
13. SANDOW K, RAMÍREZ W. Leptospirosis. *REDVET* 2005; 6(6):1-9.
14. TERPSTRA WJ, HARTSKEERL RA, SMITS HL AND KORVER H. International Course in Laboratory Techniques for the Diagnosis of Leptospirosis. Royal Tropical Institute, Amsterdam; 2000.p.
15. CACHAY ER, VINETZ JM. Aglobal research agenda of Leptospirosis. *J Postgrad Med* 2005; (51):174-178.
16. MALAJOV YA, PANIN AN, SOVOLIOVA GL. Leptospirosis de los animales 3ra ed. La Habana. Editorial Ciencias Médicas; 2007.p.24-53. ISBN 978-959-212-232-1.
17. NARANJO M, SUÁREZ M, FERNÁNDEZ C, AMADOR N, GONZÁLEZ M, GONZÁLEZ I. Study of a leptospirosis outbreak in Honduras after Match hurricane and prophylactic potentiality of vax-SPIRAL®. *VacciMonitor* 2007; 16(3):13-18.
18. GONZÁLEZ M, MARTÍNEZ R, CRUZ R, INFANTE JF, GNZÁLEZ I. Vax-SPIRAL®. Vacuna antileptospirósica trivalente para uso humano, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. *Biocología Aplicada* 2004; 2(2):107-111.
19. SILVA EF, BROD CS, CERQUEIRA GM, BOURSCHIEDT D, SEYFFERT N. Isolation of *leptospira noguchii* from sheep. *Vet Microbiol* 2007; 121(1-2):144-149.
20. BUDIONO E, SUMARDI R, RIYANTO BS, HISYAM B, HARTOPO AB. Pulmonary involvement predicst mortality in severe leptospirosis patients. *Acta Med Indones* 2009; 41(1):11-14.
21. SPICHLER AS, VILCA PJ, ATHANAZIO DA, ALBUQUERQUE JOM, CASTRO B. Predictors of Lethality in Severe Leptospirosis in Urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79(6):911-914.
22. YANG J, ZHANG Y, XU J, GENG Y, CHEN X. FERUM Activity of Platelet-Activating Factor Acetylhygrolase is a Potencial Clinical Marker for Leptospirosis Pulmonary Hemorrhage. *PLoS ONE* 2009; 4(1):41-51.
23. MSN. Ministerio de Salud de Nicaragua. Situación de la Leptospirosis en Nicaragua. *Boletín Epidemiológico (en línea)* 2004; 30(25-31 julio):22-27.
24. GONZÁLEZ A, RODRÍGUEZ Y, BATISTA N, VALDÉS Y, GONZÁLEZ M. Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55(3):146-152.
25. CULLEN PA, CORDWELL SJ, BULACH DM, HAAKE DA, ADLER B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Infect Immun* 2002; 70:2311-2318.