



ISSN: 1561-3194

Rev. Ciencias Médicas. ener-jun. 1997; 1(1):20-30

ARTÍCULO ORIGINAL

Medio de cultivo de leptospiras para la producción industrial de la vacuna cubana para animales

Leptospira culture medium to the industrial production of Cuban vaccine for animals

Hildefonso Cabezas Alfonso¹, Noemí Gainza Santos², Rosario Carrero Suárez³, Lazara Mayra Díaz Álvarez⁴, Idania Barrios Perera⁵, Caridad Gorgoy Medina⁶.

¹Profesor Titular. Agentes Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas Pinar del Río.

²Jefa del Dpto. LABIOFAM. Ciudad de La Habana.

³Jefa del Dpto. LABIOFAM. Ciudad de La Habana.

⁴Jefa del Dpto. de Investigaciones. Facultad de Ciencias Médicas Pinar del Río.

⁵Técnica de Laboratorio de Leptospira. Facultad de Ciencias Médicas Pinar del Río.

⁶Asistente de Agentes Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas Pinar del Río.

RESUMEN

La reproducción de las leptospiras siempre ha sido un dilema, ya que son bacterias algo delicadas en sus requerimientos nutricionales, más aun si se necesita obtener una concentración bacteriana alta, como es el caso que se presenta en la producción de vacuna. En el presente trabajo se exponen los resultados de un medio de cultivo logrado principalmente con materias primas cubanas. Esencialmente y lo mas importante fue la obtención de un medio de cultivo que satisface los requerimientos de estas células bacterianas, lográndose la concentración necesaria y no afectando ni la virulencia, ni la inmunogenicidad u otras características del microorganismo. Para ello se uso una sustancia estimulante de ciertas especies de pescados, sustituyendo totalmente en el cuarto pase o pase industrial, al suero de conejo, que encarecía extraordinariamente el producto. La conclusión, después de realizar innumerables experimentos en este medio y de pasar a la fase industrial con la producción de varios lotes de vacuna, es que el nuevo medio sustituye al medio Korotkof incluso, se acorta el periodo de reproducción bacteriana favoreciendo que el ciclo de producción se abrevie y se gane en productividad.

DeCS: MEDIOS DE CULTIVOS; LEPTOSPIRA\inmunologia; PRODUCTOS BIOLÓGICOS; VACUNAS BACTERIANAS; INMUNOLOGIA; VIRULENCIA.

ABSTRACT

The reproduction of leptospiras has always been controversial since they are somewhat delicate bacteria in their nutritional requirements even more if a high bacterial concentration is needed, as it happens in the reproduction of the vaccine. The results of a culture medium achieved mainly with Cuban raw materials is presented in this article. The obtention of culture medium meeting the needs of this bacterial cells is essentially the most important, obtaining the necessary concentration without affecting neither virulence nor immunogenicity or other characteristics of microorganism. A stimulating substance of certain fish specie was used totally substituting the rabbit serum in the fourth or industrial pass may it be very expensive. Summarizing after carrying out many experiments with this medium and passing to the industrial step with the production of several batches of vaccine is that the new medium substitutes the Korthof medium shortening the period of bacterial reproduction favoring the abbreviation of the production cycle increasing productivity.

DeCS: CULTURE MEDIA; LEPTOSPIRA\immunology; BIOLOGIC PRODUCTS; BACTERIAL VACCINES; IMMUNOLOGY; VIRULENCE.

INTRODUCCIÓN

Existen diversos medios de cultivo (líquidos, sólidos y semisólidos) para leptospiras, que usan suero animal (de carnero o de conejo) como son los de P. Uhlenhuth, 1916; H.Fervooth-J.Wolff, 1925; G.Korthof, 1932; C.Y.Tarassovi, 1937, R.Stuart, 1946; W.Fletcher, 1928; B.C.Kiktenko, 1954; C.Cox y A.Larson, 1957; C.K.Kanareikinai y otros, 1967; B.C. Girich, 1975; E.G.Bolina y L.E. Sarujonova, 1978; L.F. Levina y otros, 1979^{1,2,3} así como algunos medios que utilizan la fracción V de albúmina bovina y Tween 20, 40 u 80 como el de Ellinhausen. De todos modos estos medios enriquecidos no resultan generalmente económicos y factibles para la producción industrial de cultivos.

Cuando se trata de medios de cultivo para estos microorganismos tan exigentes es necesario conjugar, a escala industrial, varios factores nutricionales que a la vez que cumplan sus funciones biológicas mantenga inalterables las características de las cepas vacunales y sean factibles económicamente, lo cual no es fácil de conseguir.

El presente trabajo tiene como objetivo principal dar a conocer un nuevo medio de cultivo de leptospira para la producción industrial de vacuna cubana contra la leptospirosis animal, integrada por los serovares de *L. interrogans* mozdok, canicola y copenhageni, que prescinde totalmente del suero sanguíneo animal, empleando en su lugar una solución estimuladora a base de pescado, lo que constituye una novedad para el cultivo de estos microorganismos. Este medio se emplea actualmente en; la producción de la vacuna desde hace mas de un año y medio se produce con este medio en LABIOFAM con resultados satisfactorios. Los autores denominaron dicho medio con el nombre de CABNO.

MATERIAL Y MÉTODO

Se preparó un medio de cultivo para leptospira denominado CABNO, con los siguientes ingredientes:

PARA UN LITRO DE CULTIVO:

Elementos Proporciones

Peptona 1.0 g (BIOCEN)

NaCl 1,4 g P A

NaHCO₃ 0,02g P A

KCl 0,04g P A

KH₂PO₄ 0,24g P A

NaHPO₄ 0,88g P A

Solución estimulante 100 ml.

Agua bidestilada 1000ml

La solución estimulante sustituye el suero animal, además no se le añaden otras vitaminas como a otros medios. La sustancia estimulante se obtuvo del *Decapterus*

rhonchus y *Merlucius marlucius*. Con este medio se realizaron diversos trabajos experimentales comparándolo con el medio clásico de Korthof, enriquecido al 10% con suero de conejo.

Dichos trabajos se realizaron con dos fases, una fase experimental y otra escala semindustrial e industrial, es decir utilizando lotes industriales de vacuna con los serovares *L. interrogans* mozdok, canícola y copenhageni. Para el estudio de la concentración bacteriana se diseñó un experimento con frasco de 100 ml de medios realizando 5 pruebas con 20 replicas cada una y por cada cepa vacunal. Para la siembra de los cultivos se escogieron cultivos madres con una concentración de $2,5-3 \cdot 10^8$ células por ml. También se sembraron 20 frascos en igual forma y concentración con medio Korthof. Las mediciones de crecimiento y multiplicación se realizaron mediante microscopio de campo oscuro utilizando la cámara de Petroff - Hausser, comenzando el conteo desde el segundo día de la siembra. Se utilizó la fórmula recomendada para el conteo directo: contando 20 campos sobre el número de campos por la dilución por el factor de microscopio y por la constante 10.⁶

La morfología celular y la motilidad fueron medidas simultáneamente en cada muestra.

Se estudio la antigenicidad de las cepas en conejo de 3-3,5 kg de masa procedentes del CEMPALAB. Se emplearon 5 conejos por cepa inoculando a cada animal 1 ml de cultivo con una concentración aproximada de un millón de leptosiras por ml, por vía intravenosa (I.V), midiendo los títulos de anticuerpos (Ac) a los 21 días mediante la técnica de micro aglutinación (TAM) con cepas autóctonas y de referencia homologas.

La virulencia se estudio en masters (*Mesocricetus aureatus*) y gerbils (*Meriones unguiculatus*) de 30-40 g de masa. Para este experimento se utilizaron 10 animales por cepa de cada grupo animal. Se inocularon 0,2 ml de un inóculo preparado a partir de un macerado de órganos de hamster moribundo, que según la European Pharmacopoeia⁴ contiene generalmente entre 10-10 000 dosis letales 50 (DL50), El macerado se centrifugo y el sobrenadante se centrifugó y el sobrenadante se inyectó intraperitonealmente (i,p), con previa observación microscópica por campo oscuro del inóculo. Los animales se mantuvieron en las mejores condiciones higiénico y alimentarias observándose todos sus síntomas diariamente hasta la ocurrencia de la muerte, separados por grupos. El experimento se repitió tres veces con cada grupo animal y con cada cepa de la vacuna.

La inmunogenicidad de las cepas también se estudió en hamster y gerbil siguiendo lo orientado en la Pharmacopoeia. Para ello se prepararon cinco lotes de vacunas individuales, con los tres serovares se vacunaron cinco hamsters y cinco gerbils de 60 - 90 g de masa con 1/10 de la dosis indicada para animales adultos que en este caso era de cinco ml, por lo que vacunaron con 0,25 ml como dosis para estos animales experimentales.

Se ensayó con una dosis y con dos dosis con diez días de intervalo, siempre por la vía intramuscular (i.m). Se estableció igual número de testigos que fueron inoculados junto con los vacunados luego de 10 -14 días de observación, con un inóculo de 0,2 ml preparado según lo anteriormente descrito por la vía i.p. con cepas homologas de confrontación altamente virulentas, observándose todos los animales durante los diez días post confrontación. Se evaluó la protección de la vacuna según normas internacionales sobre la base de un 80% de protección de los vacunados y como mínimo la misma proporción de muerte de los testigos. El experimento se repitió tantas veces (cinco) como con los lotes industriales, los

cuales no se liberan sin las pruebas de confrontación por lo que se repite con cada lote al menos dos veces dicha prueba.

En la fase industrial se estudiaron cinco lotes de 500 L de cultivo de cada cepa en botellones de 20 L, en los cuales se cultivaron 10 L, es decir, que se cultivaron 50 botellones de 10 L por cepa, repitiendo esto cinco veces para lograr un volumen total de cultivos de 2 500 L por cepa. Esto se realizó durante un año y medio, evaluando todo lo anteriormente expresado: morfología, antigenicidad, virulencia, inmunogenicidad, inocuidad, estabilidad.

La inmunogenicidad de las cepas reflejada en el nivel de protección de los animales vacunados obedeció y sobrepasó las normas consideradas apropiadas internacionalmente,⁴ pues se mantuvieron niveles entre 90-100 de protección en los animales vacunados y confrontando con las cepas homologas virulentas. Tanto Hamsters como Gerbils soportaron la carga infecciosa mientras que todos los testigos morían. Tanto una como dos dosis tuvieron resultados satisfactorios. Los niveles de inmunidad no son afectados por el cultivo de las leptospiras en dicho medio. Los lotes experimentales e industriales hechos con este medio respecto a la protección no presentaron diferencias comparándolos con los estudios y el empleo industrial de más de 13 lotes fabricados con el medio Korthof.

Los trabajos con los lotes industriales que han sido empleados en otras especies animales (cerdos, bovinos y perros) no difieren en los resultados con otro medio de cultivo.

El estudio económico realizado se basó en la comparación de ciertos gastos provocados por un medio y el otro a escala industrial, teniendo en cuenta los factores siguientes: cantidad de técnicos y profesionales necesarios para hacer un medio y otro, salario devengado por día, tiempo dedicado a la extracción de sangre de conejo y carnero, volumen de sangre necesario para el medio Korthof, cantidad de pescado para la obtención de la sustancia estimulante, costo del pescado y de la sangre como tal, placas clarificantes y filtrantes, tiempo dedicado a la serología de la sangre teniendo en cuenta que esta actividad es ineludible y que se realiza con los 25 serogrupos patógenos de leptospira, cantidad de animales a sacrificar (conejos) y a sangrar (carneros), congelación del suero, tiempo de multiplicación de las bacterias en uno y otro medio.

Se calcularon los salarios de los profesionales que devengan 325 pesos mensuales, técnicos A 230, valor del litro de sangre 1 peso. No se consideró el gasto de transportación, petróleo ni salario del chofer que es considerable pues los viajes para la sangría son a los mataderos de San José de las Lajas, Pinar del Río, Matanzas y otros lugares lejanos.

No se describe la tecnología de elaboración del medio CABNO, pues es propiedad de los autores y la empresa productora LABIOFAM. Este documento es confidencial y no puede ponerse en el trabajo. Los documentos acreditativos de la liberación de los lotes industriales realizados por el laboratorio de producción, control interno de la empresa y el control estatal, se encuentran replicados en estas instancias y pueden consultarse si es pertinente.

Los cálculos de los estadígrafos se basaron en la determinación de las medias de las muestras experimentales y de orden industrial, se hizo comparación de medios entre los serovares cultivados en un medio y el otro entre ambos medios determinándose la desviación estándar y el error típico, se tuvo como confiabilidad un 95 %. Este análisis solamente se hizo respecto a las concentraciones de

gérmenes sembrados en los medios, pues las demás pruebas no requieren del análisis estadístico.

RESULTADOS

Tabla 1. Valores de concentración en millones de leptospira por mL en cinco pruebas de 20 replicas de la cepa L interrogans mozdok, Canícola y copenhageni en medio CABNO a los cinco días de cultivadas.

Pruebas de 20 réplicas	cepa mozdok			cepa Canícola			cepa copenhageni		
	X(10 ⁸)	D	ET	X(10 ⁸)	D	ET	X(10 ⁸)	D	ET
1	3,0	0,468	0,260	3,0	0,468	0,260	2,9	1,098	0,246
2	3,0	0,468	0,260	2,9	1,098	0,246	3,0	0,468	0,260
3	2,8	1,510	0,345	2,9	1,098	0,246	3,0	0,468	0,260
4	2,9	1,098	0,246	3,0	0,460	0,260	2,9	1,098	0,246
5	2,8	1,510	0,345	2,8	1,510	0,345	3,0	0,468	0,260

X = media aritmética

10⁸ = constante de conteo bacteriano

D = desviación estándar

ET = error típico

Tabla 2. Valores de concentración en millones de leptospiras por mL en cinco pruebas de 20 replicas de las cepas L. interrogans mozdok, canícola y copenhageni en medio Korthof a los 10 días de cultivadas.

Pruebas de 20 réplicas	cepa mozdok			cepa Canícola			cepa copenhageni		
	X(10 ⁸)	D	ET	X(10 ⁸)	D	ET	X(10 ⁸)	D	ET
1	3,0	0,468	0,260	3,5	0,702	0,157	3,4	0,655	0,157
2	3,4	0,655	0,157	3,2	0,637	0,142	3,1	0,768	0,167
3	3,2	0,637	0,142	3,4	0,655	0,157	3,4	0,655	0,157
4	3,0	0,468	0,260	3,1	0,768	0,167	3,3	0,762	0,158
5	2,9	1,098	0,246	3,4	0,655	0,157	3,1	0,768	0,167

X = media aritmética

10⁸= constante de conteo bacteriano

D = desviación estándar

ET = error típico

Tabla 3. Títulos de anticuerpos alcanzados a los 21 días p.i. en tres ensayos de antigenicidad inoculando 1 mL de cultivo en medio CABNO por cepa por vía i.v. empleando cinco conejos por ensayo y por cepa.

Cepa mozdok			Cepa Canícola			Cepa copenhageni		
Ensayo	título	animales	Ensayo	título	animales	Ensayo	título	animales
1	25 600	3	1	25 600	3	1	25 600	1
	51 200	2		51 200	1		51 200	4
				102 400	2			
2	51 200	2	2	25 600	1	2	51 200	2
	102 400	3		51 200	2		102 400	3
				102 400	2			
3	25 600	2	3	55 200	2	3	51 200	1
	51 200			102 400	3		102 400	4
	102 400	2						

v.i = vía intraperitoneal

p.i = post inoculación

Tabla 4. Valoración económica comparativa para la elaboración de 1 000 L de cultivo con medio Korthof y medio CABNO.

MEDIO 5% suero de 5% suero de carnero		KORTHOF de conejo	MEDIO sustancia estimulante		CABNO
RECURSOS NECESARIOS			RECURSOS NECESARIOS		
1. Sangre de conejo	100 L				
2. Sangre de carnero	100 L				
3. Conejos a sacrificar	2 500				
4. Carneros a sangrar	200		Pescado necesario	50 Kg	
5. Tiempo para sangrar 2 500 conejos	5 días durante 8 horas		Para limpiar los 50 Kg de pescado	1 día 8 horas	
6. Tiempo para sangrar 200 caninos	(2,5 días)				
7. Personal para sangrar 2 500 conejos	4 hombres por día				
8. Personal para sangrar 200 carneros	3 hombres por día				
9. Personal para decantar con bomba de suero	1 hombre durante 1 día		Personal necesario para preparar la sustancia estimulante	2 hombres durante 4 días	
10. Personal para la serología del suero trabajando 50 muestras por día	1 profesional técnico durante 2 días				
11. Placas para clasificar 100 L de suero A2	20 placas (divisas)		Placas para clasificar 100 L	10 placas (divisas)	

12. Placas filtrantes para 100 L de suero	24 placas (divisas)	Placas para filtrar, puede esterilizarse por autoclave y no usar placas	12 placas (divisas)
13. Tiempo para preparar filtro	1 técnico 2 horas	Tiempo para preparar filtro	1 técnico 2 horas
14. Valor por litro de sangre	\$ 1 peso por litro (200 pesos)	Valor de los 50 Kg de pescado	40 pesos
15. Personal dedicado a filtrar	2 técnicos 2 horas	Personal dedicado a filtrar	2 técnicos 8 horas
VALORES ESTIMADOS EN PESOS CUBANOS		VALORES ESTIMADOS EN PESOS CUBANOS	
16. Valor del trabajo por sangría de conejo a \$ 200 promedio	\$ 460.00	Valor de 50 Kg de pescado	\$ 40.00
17. Valor por sangría de carnero	\$ 100.00	limpieza de pescado	\$ 11.00
18. Valor de decantación de suero	\$ 8.00	Preparación de infusión	\$ 8.00
19. Preparación de filtro	\$ 2.60	Presentación de filtro	\$ 2.60
20. Valor de serología	\$ 50.00	Filtración de la infusión	\$ 22.00
21. Valor de la sangre	\$ 200.00		
22. Filtración de suero	\$ 30.00		
TOTAL	\$ 850.60		\$ 83.60

DISCUSIÓN

Como se puede apreciar (Tabla 1), el crecimiento y multiplicación de las cepas estudiadas se produjo rápidamente y en el quinto día alcanzo su máxima concentración en el medio CABNO, acortando el tiempo de empleo de los cultivos para la elaboración de la vacuna de 3-5 días con respecto al medio Korthof (Tabla 2), donde las cepas requieren un tiempo mayor (8 -10 días). Al comparar las medias de los grupos experimentales con CABNO y Korthof se aprecia que no existen diferencias significativas en ninguna de las cepas estudiadas, tanto en la fase del experimento planteado como en la fase de cultivos industriales hechos en botellones con 10 L de cultivo, pues los conteos se realizan si empre como control.

El medio Korthof venia analizándose durante años e históricamente mantiene los niveles de concentración reflejados en la tabla 2, es un medio de conservación que se venia utilizando en la reproducción industrial hasta encontrar esta nueva alternativa, no obstante, en los tres primeros pases de la semilla se utiliza este medio, ya que no se requieren grandes cantidades como en la fase industrial que son los pases cuarto y quinto, pues resulta muy costoso por el uso del suero animal y otros elementos del medio.

Se comprobó mediante las mediciones diarias que luego de 5 días de cultivadas las cepas en el medio CABNO, comenzaba a notarse un decrecimiento vertiginoso y por lo tanto se tomo el quinto día como el momento optimo de la fase loga rítmica para su utilización.

Todo parece indicar que en ese crecimiento inicial rápido o logarítmico, las bacterias en el medio CABNO consumen casi todos los nutrientes del mismo con un empleo

muy eficiente de los ácidos grasos de largas cadenas carbonadas que contiene dicho medio, principalmente a partir del ácido araquidónico y el eicosapentanoico, además de la utilización de aminoácidos contenidos aportados por la sustancia estimulante como son la lisina, metionina, triptofano y otros elementos como fósforo, calcio, manganeso, iodo, vitamina B12, riboflavina, niacina y colina que se saben abundan en productos del pescado.

Se plantea que 1 kg de pescado aporta entre 600-2200 calorías dependiendo del contenido de aceite que puede llegar hasta un 17%, así como el contenido de proteínas hasta el 20%. Este crecimiento y multiplicación acelerada en estos primeros días prueba que biológicamente el medio reúne los requisitos de exigencias nutricionales, para que se realicen todos los procesos enzimáticos internos y externos de la bacteria así como las funciones de transporte activo de membrana sin ningún inconveniente manteniendo una concentración de sustrato interno suficientemente alta en relación con el medio exterior que garantiza dicho metabolismo acelerado.

La virulencia en el hamster y gerbils se produjo en el mismo lapsus que como se había demostrado en medio Korthof, siendo el gerbils más susceptible. La muerte se produjo entre 5-6 días por mozdok y Canícola y entre 6-7 días por copenhageni en el Hamster y todas cepas mataron al Gerbils entre 3 y 4 días. El 100% de los animales murieron en un periodo que permite considerar que las cepas eran altamente virulentas lo que demuestra que el medio no influyó en dicha característica negativamente.

La morfología y motilidad son adecuadas en el medio estudiado, pues no se presenta a la observación directa, de formaciones celulares estructurales con un aumento de 400 X y la motilidad es normal con los característicos movimientos de la bacteria.

Una propiedad de este medio es una transparencia lo que permite tanto macro como microscópicamente observar mejor los cultivos sin los frecuentes precipitados y turbidez que se aprecian en los medios a base de suero sanguíneo animal, favoreciendo una precisión mayor de la morfología bacteriana. Permite este medio una homogeneidad mayor en cuanto a tamaño sin esas formas groseramente alargadas que adquieren las leptospiras cuando envejecen demasiado.

La antigenicidad (tabla 3), reflejo títulos de anticuerpos elevados en el enfrentamiento del suero problema con las cepas homologas autóctonas y de referencia, lo que indica que las cepas funcionaron antigénicamente igual que como se había comprobado en todos los casos anteriores cultivados en el medio Korthof durante dos años de trabajo. El título máximo se alcanzó a los 21 días p.i. demostrando también en otras especies.⁵⁻¹⁰

Dentro de las diferencias que más favorecen, en el orden industrial, al medio CABNO con respecto al medio Korthof son las ventajas económicas (Tabla 4) que refleja según algunos factores evaluados su alta eficiencia económica, su factibilidad y fácil realización. Es decir que mantiene los niveles biológicos requeridos y además ahorra recursos humanos y materiales.

Se multiplican los valores de gastos para cultivar una cepa por los tres serovares que integran la vacuna los cuales ascenderían entonces a \$2551.80 para preparar el medio de cultivo Korthof contra una cantidad de solamente \$250.80 pesos para preparar el medio CABNO. En estos conservadores y grandes cálculos, no se incluyen los valores en divisa para placas clarificantes y filtrantes, que para el medio CABNO se requiere solamente del 50% de las mismas ya que es más fácil de

filtrar. Las sustancia estimuladora bien clarificada puede esterilizarse por autoclave prescindiendo del filtrado lo que ahorraría aun más, esto no puede hacerse con el suero animal. No se incluyen los gastos de transporte que son incalculables. Todo lo expuesto en la tabla 4 se refiere solamente al trabajo con el suero y la sustancia estimuladora.

No se incluyeron tampoco los medios de cultivo necesarios para el control del suero antes de su uso, lo cual conllevaría a gastos adicionales por concepto de contaminaciones, etc. Tampoco la utilización del pilietilenglicol 6 000 para tratar los sueros positivos que requerirían de una nueva serología aumentado como suele ocurrir los gastos por este concepto. El trabajo con estas grandes cantidades de cultivo es facilitado extraordinariamente con la sustancia estimuladora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kiktenko VS. Leptospiroz. Mosckva; 1985: 24 -26.
2. Volina EG, Kiktenko VS, Sarokhanova LE, Levina LF, Arotynova GA, Sobaleva GL . Investigation of hemolytic activity of Leptospiras on solid c ulture media. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology, Czechoslovak Medical Press 1985; 1: 79-85.
3. Cox CO, Larson AD. Colonial growth of Leptospirae. J Bact 1957; 73:587-9.
4. European Pharmacopoeia 1977. Office International of E pizotis (OIE). Recomend Diagnosis Tecniques and Requerimients for Biological Products 1990;2(Supl3):8-9.
5. Perolat P, Merien F, Ellis WA, Baranton G. Characterization of Leptospira Isolates from Serovar Hardjo by Ribotyping Arbitrarily Primed PCR, and Mapped Restriction Site Polimorphisms. Journal of Clinical Microbilogy 1994;32:1942 -1957.
6. Bal AE, Graukam C, Hartskeer LA, De Meza Brewster J, Korver H, Tersptra J. Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. J Clin Microbil 1994;32:1895-1898.
7. Harbek RS, Giclas PC. Diagnostic Immunology Laboratory Manual. New York : Raver Press;1991:119-127.
8. Fischbach F. A Manual of Laboratory Diagnostic Test.4a.ed. Philadelphia;1992:465-473.
9. Cacciapuoti B, Ciceroni L, Pinto A, Apollini M, Rondinella V, Bonimi U ,et al. Survey on the prevalence of Leptospira infectious in the Italian population. European Journal of Epidemilogy 1994;10:173 -180.
10. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of Polymerasa Chain Reaction Witth Microagglutination Test and Culture for Diagnosis of Leptospire. Journal Infection Deseases;1995:281 -285.

Recibido: 25 de noviembre 1996.

Aprobado: 23 de diciembre 1996.

Dr. Hidelfonso Cabezas Alfonso. Facultad de Ciencias Medicas Km 89 Carret era Central Pinar del Río. CP 20200. Cuba