

ARTÍCULOS ORIGINALES

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Desarrollo de un método para determinar la concentración mínima inhibitoria en cepas de referencias de leptospiras

Lic. Ana Margarita Obregón,¹ Dr. Rafael Llanes,² Dra. Carmen Fernández,³ Lic. Idialis Hernández⁴ y Téc. José Rodríguez⁵

RESUMEN

Se desarrolló un método para determinar la concentración mínima inhibitoria para las leptospiras, porque internacionalmente no existe un método estándar para medirla. Se utilizaron cepas de referencia, pertenecientes al complejo patogénico *L. interrogans* y *L. biflexa* frente a la penicilina, la ciprofloxacina, el cloranfenicol, la rifampicina, y la tetraciclina. La concentración mínima inhibitoria, fue definida como la menor concentración del antibiótico donde se observó la inhibición de la movilidad bacteriana por *examen directo en campo oscuro*. Los rangos fluctuaron para la penicilina desde 0,095 hasta 12,52 µg/mL, para la tetraciclina desde 0,156 hasta 3,13 µg/mL, para el cloranfenicol desde 0,08 hasta 12,52 µg/mL, para la rifampicina desde 0,08 µg/mL y hasta 1,56 µg/mL y para la ciprofloxacina desde 0,15 hasta 2,4 µg/mL. Los antibióticos que presentaron los valores más bajos fueron la ciprofloxacina, la rifampicina y la tetraciclina y el valor más elevado se obtuvo frente el cloranfenicol y la penicilina. En esta investigación fueron empleadas las cepas de los serogrupos que circulan más frecuentemente en Cuba. Este estudio permitirá en un futuro cercano, determinar la susceptibilidad antimicrobiana en cepas autóctonas aisladas de pacientes con leptospirosis, al nivel nacional.

Palabras clave: Leptospirosis, leptospira, susceptibilidad, concentración mínima inhibitoria.

Las leptospiras son sensibles a casi la totalidad de los antibióticos. Las penicilinas, el cloranfenicol, la rifampicina y el metronidazol, resultan los más ampliamente usados en la terapéutica para humanos. A pesar de estos elementos, ya aparecen reportes que indican la existencia de pacientes que no resuelven con la terapéutica clásica establecida para el enfrentamiento de esta entidad.¹

No es usual buscar leptospiras por la susceptibilidad de antibióticos para casos clínicos

individuales porque el aislamiento, si lo hay, no es concluido hasta que el paciente esté bien avanzado en la enfermedad o se ha recuperado de esta.¹⁻³

Para medir objetivamente la capacidad antimicrobiana de los antibióticos se han establecido las categorías de *concentración mínima inhibitoria* (CMI) y la *concentración mínima bactericida* (CMB), sin embargo, para las leptospiras no aparece normado ningún método de referencia.^{2,3}

¹ Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Médico Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

³ Máster en Ciencias. Médico Veterinario. Investigador Auxiliar. IPK.

⁴ Licenciada en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

⁵ Técnico en Microbiología. IPK.

En un primer momento el método estándar utilizado para las pruebas *in vitro* capaz de medir la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue el de dilución en agar. Posteriormente se utilizó el método de dilución en caldo, que proporciona con mayor exactitud un resultado cuantitativo de la concentración del agente antimicrobiano necesaria para inhibir el desarrollo de un organismo.³

Partiendo de la importancia que reviste el conocimiento del fenómeno de resistencia de los microorganismos en la actualidad a los antimicrobianos y del hecho de que en Cuba no se ha realizado un estudio que permita evaluar el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de leptospiras, los autores de este trabajo se propusieron desarrollar un método para determinar la CMI utilizando cepas de referencia, pertenecientes al complejo patogénico *L. interrogans* y *L. biflexa* frente a 5 antibióticos comúnmente empleados en la terapéutica de esta enfermedad, lo que permitirá en un futuro cercano, comenzar el estudio de los aislamientos autóctonos circulantes nacionalmente.

MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental con las cepas de referencia: *Ballum ballum* cepa MUS-127, *Canicola canicola* cepa Hond Utrecht- IV, *Semarang patoc* cepa patoc I, *Ictero-haemorrhagiae copenhageni* cepa M-20, *Pomona pomona* cepa pomona, *Manhao manhao* cepa LGO, *Tarassovi tarassovi* cepa perepelicin, pertenecientes al cepario de colección del Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Estas cepas fueron elegidas por representar los serogrupos de leptospiras que circulan más frecuentemente en Cuba.

Las cepas fueron subcultivadas en medio líquido de Korthof, suplementado con el complejo de enriquecimiento formado por sales, vitaminas, ácido oleico, albúmina y Tween 80 (SAVAT). Los cultivos fueron incubados a 30 °C, durante 15 d.

Durante toda la experiencia a los subcultivos se les midió la densidad óptica (DO) a una λ de 430 nm, por intervalos de 48 h. Se realizó una curva de crecimiento por cepa, para determinar la fase

exponencial. Al ajustar este parámetro, se añadió 1 mL de cada subcultivo a nuevos tubos (con medio de cultivo de Korthof), los cuales contenían las diluciones de cada droga.

Las drogas antimicrobianas utilizadas fueron la penicilina (MERCK), ciprofloxacina (SIGMA), cloranfenicol (SIGMA), rifampicina (SIGMA), tetraciclina (SIGMA). Estas fueron diluidas en sus respectivos solventes (agua o etanol absoluto) hasta alcanzar un rango de concentración que fluctuó desde 12,52 y hasta 0,04 $\mu\text{g/mL}$. Solamente la ciprofloxacina fue diluida hasta alcanzar una concentración final de 0,15 $\mu\text{g/mL}$. Se realizaron ensayos por duplicados.

Una vez incubadas todas las siembras a 30 °C, fueron realizadas lecturas de las densidades ópticas utilizando una $\lambda = 430\text{nm}$, en los momentos siguientes: T0= día de siembra, T2= 48 h (2 d), T3= 96 h (4 d), T4= 120 h (5 d), T5= 144 h (6 d), T6= 168 h (7 d), T7= 192 h (8 d), T8= 216 h (9 d), T9= 240 h (10 d), T10= 264 h (11d), T11= 288 h (12d), T12= 312 h (13d), T13= 336 h (14d), y T14= 360 h (15d). Cada valor de DO fue llevado a un gráfico para obtener curvas correspondientes a la cinética de crecimiento de cada cepa frente a cada antibiótico.

Paralelamente, y durante cada uno de los momentos de tiempo citados antes, una gota de cada siembra fue tomada asépticamente y observada por microscopía en campo oscuro. Para cada experimento se dejó un tubo control por cepa, el cual estaba libre de antibiótico.

La CMI se estableció en función de la menor concentración del antibiótico donde se observó la inhibición de la movilidad bacteriana por *examen directo en campo oscuro*. En algunos casos se tuvo en consideración la lectura de la densidad óptica.

Los resultados se interpretaron tomando en consideración las categorías de sensible (S), susceptibilidad intermedia (SI) y resistente (R). Aquella cepa cuya movilidad fue totalmente inhibida por las concentraciones del antibiótico se catalogó como S, mientras que la cepa cuya movilidad fue inhibida en 50 % del campo óptico, por las concentraciones usadas se denominó como SI y la que su movilidad no fue inhibida por las concentraciones empleadas se llamó como R.

RESULTADOS

El promedio de los valores de DO de cada cepa sembrada en medio libre de antibiótico, aparece en la tabla 1. Puede observarse que el comportamiento del crecimiento bacteriano, fue similar para las 7 cepas en estudio. La fase exponencial se definió desde el día de inoculación (T0) y hasta el octavo día de incubación (T6), correspondiente a las 192 h posinoculación. A partir del T7 (216 h), se estableció la fase estacionaria. Durante todo el ensayo fueron observados los cultivos por examen directo en campo oscuro, y en todos los tubos se apreció un crecimiento satisfactorio (aproximadamente 200 células/campo óptico), apareciendo las células con su clásico movimiento rotatorio.

En la tabla 2 se muestran los valores de CMI de cada antibiótico frente a las 7 cepas de leptospiras. Los rangos de CMI para la penicilina, fluctuaron desde 0,095 hasta 12,52 $\mu\text{g/mL}$, para la

tetraciclina desde 0,156 hasta 3,13 $\mu\text{g/mL}$, para el cloranfenicol desde 0,08 hasta 12,52 $\mu\text{g/mL}$, para la rifampicina desde 0,08 $\mu\text{g/mL}$ y hasta 1,56 $\mu\text{g/mL}$ y para la ciprofloxacina desde 0,15 hasta 2,4 $\mu\text{g/mL}$. De forma general los antibióticos que presentaron los valores de CMI más bajos fueron la ciprofloxacina, rifampicina y la tetraciclina y el valor más elevado se obtuvo frente el cloranfenicol y la penicilina. La cepa patoc I, presentó el valor más elevado de CMI (12,56 $\mu\text{g/mL}$), frente a la penicilina y el cloranfenicol. La cepa perepelicin del serovar tarassovi presentó los valores más inferiores de CMI.

En la tabla 3 aparecen los resultados de la susceptibilidad de las cepas de leptospiras frente a las drogas utilizadas. El serovar ballum cepa MUS -127, fue resistente frente a la penicilina y la rifampicina. Con respecto al cloranfenicol y la ciprofloxacina, se encontró el mismo fenómeno a pesar de que los valores de DO, se encontraron por debajo de los de la curva

TABLA 1. Valores de DO a $\lambda= 430$ nm de las cepas de leptospira en medio de cultivo sin antibiótico

Tiempo	patoc	ballum	canicola	Serovares copenhageni	pomona	tarassovi	manhao
T0	0,075	0,028	0,056	0,043	0,037	0,051	0,035
T1	0,11	0,06	0,071	0,081	0,067	0,069	0,0618
T2	0,174	0,096	0,1	0,148	0,081	0,085	0,076
T3	0,2	0,117	0,129	0,178	0,092	0,095	0,085
T4	0,212	0,14	0,14	0,194	0,104	0,115	0,0946
T5	0,226	0,156	0,147	0,21	0,1168	0,137	0,1072
T6	0,214	0,156	0,153	0,225	0,123	0,134	0,116
T7	0,198	0,158	0,145	0,236	0,124	0,127	0,111
T8	0,174	0,138	0,139	0,23	0,123	0,117	0,111
T9	0,167	0,13	0,134	0,228	0,123	0,11	0,11
T10	0,171	0,116	0,133	0,23	0,122	0,105	0,108
T11	0,16	0,11	0,134	0,23	0,1101	0,097	0,103

TABLA 2. Valores de CMI de cada antibiótico frente a las 7 cepas de leptospiras

Antibióticos	Valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) de cada droga frente a:						
	1	2	3	4	5	6	7
Penicilina	>1,56	0,78	0,095	1,56	0,15	>0,08	12,52
Tetraciclina	3,13	0,78	0,78	0,2	0,156	>0,8	0,78
Cloranfenicol	>4	4	0,25	>1,56	>2,4	>0,08	12,52
Rifampicina	>1,56	>1,56	0,095	>1,56	>2,4	>0,08	1,56
Ciprofloxacina	>2,4	0,15	0,15	0,15	0,3	>2,4	1,2

1: serovar ballum cepa MUS 127, 2: serovar canicola cepa Hond Utrech IV, 3: serovar copenhageni cepa M 20, 4: serovar manhao cepa LGO, 5: serovar pomona cepa pomona, 6: serovar tarassovi cepa perepelicin, 7: serovar patoc cepa patoc 1

TABLA 3. Susceptibilidad de las cepas de leptospiras frente a los antibióticos empleados

	1	2	3	4	5	6	7
Penicilina	R	SI	S	R	S	R	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S	R	S
Cloranfenicol	R	SI	SI	R	R	R	S
Rifampicina	R	R	SI	R	R	R	S
Ciprofloxacina	R	S	S	S	S	R	S

1: serovar ballum cepa MUS 120, 2: serovar canicola cepa Hond Utrech -IV, 3: serovar copenhageni cepa M-20, 4: serovar manhao cepa LGO, 5: serovar pomona cepa pomona, 6: serovar tarassovi cepa perepelicin, 7: serovar patoc cepa patoc I, R: resistente, SI: sensibilidad intermedia, S: sensible.

patrón. Esta cepa fue susceptible frente a la tetraciclina, en las concentraciones de: 1,24, 0,62 y 0,31 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Sin embargo, fue resistente para las concentraciones de 0,155 y 0,0775 $\mu\text{g/mL}$. Los valores de DO encontrados estuvieron todos por debajo de los de la curva patrón (tabla 3).

El serovar canicola cepa Hond Utrech IV, fue resistente frente a la rifampicina, a las concentraciones de 0,39, 0,19 y 0,095 $\mu\text{g/mL}$ de la penicilina, y a las de 2, 1, 0,5 y 0,25 $\mu\text{g/mL}$ del cloranfenicol; mientras que frente a las concentraciones de 1,56 y 0,78 $\mu\text{g/mL}$ de la penicilina, alcanzó la categoría de susceptibilidad intermedia y a la de 4 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol, fue susceptible en 50 %. Para la tetraciclina y la ciprofloxacina, esta cepa fue susceptible.

El serovar copenhageni cepa M-20, presentó susceptibilidad intermedia frente a todas las concentraciones evaluadas de la rifampicina y el cloranfenicol. En este caso, los valores de DO estuvieron por debajo de los de la curva patrón. Frente a la penicilina, tetraciclina y ciprofloxacina, fue susceptible.

El serovar manhao cepa LGO, fue resistente frente a todas las concentraciones ensayadas del cloranfenicol y la rifampicina. En este caso, los valores de DO encontrados aparecen por debajo de los reportados por la cepa control. Frente a la penicilina en la concentración de 1,56 $\mu\text{g/mL}$, fue susceptible en 50 %, y para el resto de las concentraciones (0,6; 0,39; 0,04 y 0,02 $\mu\text{g/mL}$) fue resistente, aunque los valores de DO se presentaron por debajo de la curva patrón. Esta cepa fue susceptible frente a la tetraciclina y la ciprofloxacina.

El serovar pomona cepa pomona, fue resistente al cloranfenicol, la rifampicina, a la concentración de 0,078 $\mu\text{g/mL}$ de la tetraciclina, a la de 0,15 $\mu\text{g/mL}$ de la ciprofloxacina y susceptible a la penicilina. A las concentraciones de 2,4; 1,2, 0,6 y 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de la ciprofloxacina y a los 1,248; 0,624; 0,312 y 0,156 $\mu\text{g/mL}$ de la tetraciclina fue susceptible.

El serovar tarassovi cepa perepelicin, fue resistente frente a todas las concentraciones de los antibióticos estudiados, mientras que la cepa patoc 1 del serovar patoc fue sensible.

De forma general, la mayoría de los serovares de leptospiras fueron sensibles a las drogas ensayadas. Sin embargo la cepa perepelicin del serovar tarassovi a pesar de haber reportado los valores más bajos de CMI fue resistente frente a todos los antibióticos ensayados. La cepa MUS 127 del serovar ballum fue resistente a 4 de los 5 antibióticos evaluados. Las cepas LGO (serovar manhao), y pomona (serovar pomona) presentaron resistencia frente a los antibióticos de cloranfenicol y rifampicina. La cepa patoc I del serovar patoc fue sensible a todos los antibióticos en estudio.

DISCUSIÓN

A diferencia de otras bacterias, no existe en el caso de las espiroquetas un método uniforme y estandarizado para el análisis de la susceptibilidad (CMI) frente a los diferentes agentes antimicrobianos. En esta investigación fue utilizado el método de macrodilución en caldo, empleando el medio de cultivo Korthof. Este medio utiliza como suplemento la albúmina bovina fracción V. Algunos autores, entre ellos *Oie S* y otros en 1983, refieren

que la presencia de albúmina bovina 1 % (proteína sérica) en este medio tiene poca influencia en las bajas cifras de CMI reportada para algunos antibióticos.^{3,4}

Las lecturas de las densidades ópticas a pesar de que no fue el parámetro determinante para ejercer un criterio de CMI en esta investigación, sí ayudó a la mejor comprensión de la cinética de crecimiento de cada serovar frente a las diluciones de cada antibiótico. La turbidimetría es un método que ha sido utilizado para evaluar el efecto de nuevas drogas, ejemplo la carboxiquinolona en cepas de *L. interrogans* pertenecientes a los serogrupos: Icterohamorrhagiae, Hebdomadis, Australis, Autumnalis, y Canicola, y con ello se han podido establecer la cinética de crecimiento de estos serogrupos frente a estos antibióticos.⁵

La concentración inicial del inóculo para cada cepa usada en este estudio se estableció teniendo en consideración los trabajos de *Oie S* y otros en 1983, y *Murgia R* y otros en el 2000.^{5,6}

La observación de cada cultivo por microscopía en campo oscuro determinó en todos los casos la resistencia, susceptibilidad intermedia o sensibilidad de las cepas estudiadas frente a los antibióticos. Algunos reportes aparecen en la literatura que avalan la utilidad práctica de esta tecnología. Así por ejemplo están los trabajos de *Takashima I* y otros en 1993, quienes afirman que el conteo celular en campo oscuro en presencia de la droga corresponde perfectamente con la turbidez visible y permite obtener resultados más confiables al determinar la CMI.⁵

La CMI (para las borrelias y leptospiras) se mide generalmente considerando la más baja concentración del antimicrobiano que inhibe la movilidad del microorganismo observada por EDCO, después de 48 a 72 h de incubación si se utiliza el método de microdilución en caldo.⁷

La actividad *in vitro* de la ciprofloxacina y las tetraciclinas contra el complejo patogénico de *L. interrogans* y en particular contra el serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar budapest, fue estudiada por *Shalit I* y otros en 1989. En este estudio se demostró que la ciprofloxacina es efectiva *in vivo* e *in vitro* contra las cepas de *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae.⁸

Takashima I y otros en 1993, evaluaron el efecto de una nueva carboxiquinolona en 5 cepas

de *L. interrogans in vitro*, comparándola con la ofloxacina, ciprofloxacina, tosufloxacina y la tetraciclina, demostrando que las cepas del serogrupo Icterohamorrhagiae, tienden a ser más resistentes a la acción bactericida de las quinolonas.⁵

Aunque no es un fenómeno muy frecuente, ya comienzan a aparecer algunas cepas de leptospiras resistentes a la penicilina, por el uso indiscriminado para muchas infecciones bacterianas.⁹ En esta investigación, las cepas MUS 120, LGO y perepelicin fueron resistentes frente a la penicilina. Aunque el mayor número de cepas resistentes se presentó frente a la rifampicina y el cloranfenicol, aspecto que coincide con lo encontrado en la literatura.¹⁰

Al comparar los valores de CMI reportados en la literatura con los de este estudio se observó que en la cepa Hond Utrech IV del serovar canicola, la cifra frente a la tetraciclina fue inferior y frente al cloranfenicol superior.^{4,11,12}

El valor de CMI de la penicilina y la tetraciclina del serovar copenhageni en este trabajo fue menor que el reportado por *Oie S* y otros en 1983.⁴

No existen reportes que puedan compararse con los resultados de la CMI en la cepa LGO del serovar manhao. La selección de esta cepa estuvo principalmente avalada, porque este serovar, es aislado frecuentemente en Cuba, en muchos bovinos, sin embargo en los humanos se desconoce su circulación.

Los valores de CMI frente a la penicilina y la tetraciclina en el caso del serovar pomona cepa pomona, fueron menores a los reportados por otros autores;^{13,14} para el cloranfenicol, la rifampicina y la ciprofloxacina, no existen reportes internacionales.

En este estudio el serovar tarassovi, presentó resistencia frente a los antibióticos evaluados. Sin embargo *Spradbrow P* en 1963 reportó que este serovar era sensible a la penicilina y la tetraciclina.¹⁴

El serovar patoc cepa patoc I presentó valores superiores de CMI para la penicilina y el cloranfenicol y menores para la tetraciclina y la rifampicina a lo reportado por otros investigadores.⁴

Con esta investigación realizada por vez primera en Cuba, se logró desarrollar un método que permitió determinar la susceptibilidad *in vitro*

de cepas de referencia de leptospiros frente a diferentes antibióticos. Fueron empleados los serogrupos tipos de leptospiros, que circulan más frecuentemente en el país. El valor más elevado de CMI se obtuvo frente a la penicilina y el cloranfenicol. Las cepas de los serovares de tarassovi y ballum mostraron resistencia frente a la mayoría de los antimicrobianos, siendo el resto de las cepas sensibles a las drogas estudiadas. Este estudio, permitirá en un futuro cercano, determinar la susceptibilidad antimicrobiana en cepas autóctonas aisladas de pacientes con leptospirosis al nivel nacional.

Development of a method to determine the minimum inhibitory concentration in reference strains from leptospiros

SUMMARY

A method to determine the minimum inhibitory concentration for leptospiros was developed, since there is not a standard method to measure it at the international level. Reference strains from the pathogenic complex *L. interrogans* and *L. biflexa* were used against penicillin, cyprofloxacin, chloramphenicol, rifampicin and tetracycline. The minimum inhibitory concentration was defined as the lowest concentration of antibiotic where it was observed the inhibition of the bacterial mobility by direct examination in dark field. Ranges for penicillin were from 0.095 to 152 µg/mL, for tetracycline from 0.156 to 3.13 µg/mL, for chloramphenicol, from 0.08 to 12.52 µg/mL, for rifampicin from 0.08 to 1.56 µg/mL, and for cyprofloxacin from 0.15 to 2.4 µg/mL. The antibiotics that showed the lowest values were cyprofloxacin, rifampicin and tetracycline, whereas the most elevated value was obtained against chloramphenicol and penicillin. The strains from the serogroups circulating more frequently in Cuba were used in this research. This study will allow in a near future to determine the antimicrobial susceptibility in autochthonous strains isolated from patients with Leptospirosis at the national level.

Key words: Leptospirosis, leptospiros, susceptibility, minimum inhibitory concentration.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha P, Sufres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3

- ed. Washington, DC: OPS; 2001. (Publicación Científica y Técnica No. 580).
2. Alexander A, Rule P. Penicillins, cephalosporins and tetracyclines in treatment of hamsters with fatal Leptospirosis. *Antimicrob Agen Chemother* 1986;30:835-9.
 3. Lepto TEK Dri Dot for the human leptospirosis Diagnosis. Disponible en: <http://www.danival.org/microlin/antibiot/antibiot-106-pruebasensil> (12 de enero de 2004).
 4. Oie S, Hironaga Z, Koshiro A, Konishi H, Yoshii Z. In vitro susceptibilities of five leptospiros strains to 16 antimicrobial agents and chemotherapy. *Antimicrob Agen Chemother* 1983; 24:905-8.
 5. Takashima I, Nigoma M, Hashimoto N. Antimicrobial effects of a new carboxyquinolone drug: Q-35 on five serogroups of *L. interrogans*. *Antimicrob Agen Chemother* 1993; 37(4):901-2.
 6. Murgia R, Marchetti F, Cinco M. Comparative bacterostatic and bactericidal activity of cefodizime on *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Antimicrob Agen Chemother* 1999;43:3030-2.
 7. Cevenini R. Comparative in vitro activity of five cathelicidin derived synthetic peptides against Leptospiros, borrelias and *Treponema pallidum*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:895-902.
 8. Shailit I, Barnea A, Shahar A. Efficacy of ciprofloxacin against *L. interrogans* serogroup Icterohamorrhagiae. *Antimicrob Agen Chemother* 1989; 33:788-9.
 9. Prescott J, Miller R, Nicholson V. Isolation of *Leptospira hardjo* from kidneys of Ontario cattle at slung. *Can J Vet Res* 1987;51:229-31.
 10. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2 ed (Reprinted 2000) MediSci@Melbourne; 1999.p.109.
 11. Ellison D, MacConnell S, Alexander A, Yager R, Rigg J. Use of antibiotics in the preparation of canine tissue culture vaccines to eliminate leptospiral infection hazards. *Appl Microbiol* 1965;13:595-9.
 12. Cameron G. The susceptibility of N. Zealand isolates of leptospires to three antibiotics. *N Zeland Med J* 1977; 86:93-4.
 13. Wylie J. The sensitivity of organisms of the genus *Leptospira* to penicillin and streptomycin. *J Pathol Bacteriol* 1946;59:247-54.
 14. Spradbrow P. Sensitivity to drugs of Australian leptospiral serotypes. *Br J Pharmacol* 1963;20:230-6.

Recibido: 27 de diciembre de 2004. Aprobado: 10 de marzo de 2005.

Lic. Ana Margarita Obregón. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2 , AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana. Teléf :202-04-36 al 45. Correo electrónico: amobregon@ipk.sld.cu