

LEPTOSPIROSIS

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La leptospirosis es una enfermedad transmisible que afecta tanto a los animales como al ser humano causada por una infección por cualquiera de los agentes patógenos del género *Leptospira*. La leptospirosis aguda debe sospecharse en los siguientes casos: aparición repentina de agalaxia (en ganado vacuno u ovino adulto en lactación), ictericia y hemoglobinuria, sobre todo en animales jóvenes, meningitis e insuficiencia renal aguda o ictericia en el perro. La leptospirosis crónica debe plantearse en los siguientes casos: aborto, nacidos muertos, nacimiento de animales débiles (tal vez prematuros), infertilidad, insuficiencia renal crónica o hepatitis activa crónica en perros, y casos de oftalmia periódica en caballos.

El diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis puede ser complejo e implica pruebas que se dividen en dos grupos. Uno de los grupos de pruebas está diseñado para detectar los anticuerpos antileptospiras, el otro está diseñado para poner en evidencia las leptospiras, antígenos de leptospiras o ácidos nucleicos de leptospiras en tejidos animales o en líquidos corporales. El conjunto de pruebas concretas seleccionadas depende del objetivo de la prueba (por ejemplo, los estudios de rebaños o el diagnóstico en un animal aislado) y de las pruebas o de la experiencia de la que se disponga en la zona.

Detección del agente: El aislamiento y la detección de las leptospiras en:

- a) varios órganos internos (como el hígado, el pulmón, el cerebro y el riñón) y en los líquidos corporales (la sangre, la leche, los líquidos cerebroespinal, torácico y peritoneal) de los animales infectados clínicamente, en cuyo caso proporciona un diagnóstico definitivo de la enfermedad clínica aguda o, en el caso de un feto, de la infección crónica de la madre.
- b) el riñón, la orina o en el tracto genital de animales sin signos clínicos, en cuyo caso solo es un diagnóstico de un estado de portador crónico.

El aislamiento de leptospiras a partir de material clínico y la identificación de las cepas constituyen procesos de larga duración, y se realizan en laboratorios de referencia especializados. El aislamiento seguido de la tipificación a partir de portadores renales es importante y muy útil en los estudios epidemiológicos para determinar qué serotipos están presentes en un grupo concreto de animales, en una especie animal o en una región geográfica.

La comprobación de la presencia de leptospiras mediante pruebas inmunoquímicas (inmunofluorescencia e inmunohistoquímica) se adapta más a la mayoría de las condiciones de laboratorio. Sin embargo, la eficacia de estas pruebas depende del número de microorganismos que estén presentes en el tejido y carecen de la sensibilidad de un cultivo. A menos que se utilicen reactivos especialmente elaborados, las pruebas inmunoquímicas no identifican el serotipo infectante, y sus resultados deben interpretarse en conjunto con los resultados serológicos. Los reactivos para inmunofluorescencia se elaboran mejor con sueros antileptospira con un título alto de IgG, que no están disponibles comercialmente. Para las pruebas inmunohistoquímicas puede utilizarse suero de conejo o anticuerpos monoclonales para la tipificación de leptospiras, y están disponibles en los laboratorios de referencia de leptospiras.

La presencia de material genético de leptospiras en los tejidos o en los líquidos corporales se puede poner de manifiesto empleando diversas pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), bien sea en tiempo real o en formatos clásicos. Las PCR son sensibles, pero los procedimientos de control de calidad y el procesamiento de las muestras para la PCR son cruciales y deben adecuarse al tejido, al líquido y a la especie que se esté analizando. Al igual que

ocurre con las pruebas inmunoquímicas, con la PCR no se identifica la serotipo infectante, aunque algunos identifican la especie.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas constituyen el medio más ampliamente utilizado para el diagnóstico de la leptospirosis, y la prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba serológica estándar. Los antígenos seleccionados para su utilización en la MAT deben incluir las cepas representativas de los serogrupos que existen en la región concreta, además de aquellos que se sabe que persisten en otra región en la especie hospedadora objeto de estudio.

La MAT se utiliza principalmente para diagnosticar la enfermedad en individuos y en rebaños. Como prueba en un animal individual, es muy útil para diagnosticar una infección aguda: el incremento de cuatro veces en los títulos de anticuerpos en los sueros pareados de animales con infección aguda o convalecientes constituye un diagnóstico claro. Para la obtención de información útil, se deben examinar al menos diez animales o el 10% del rebaño, el que mayor sea, y documentar el historial de vacunación de los animales.

La MAT tiene limitaciones en el diagnóstico de la infección crónica en los animales aislados y en el diagnóstico de las infecciones endémicas de los rebaños. Los animales infectados pueden abortar o ser portadores renales y genitales mostrando títulos de MAT por debajo del título mínimo significativo ampliamente aceptado de 1/100 (dilución final).

Los enzoinmunoanálisis (ELISA) también pueden ser útiles para la detección de anticuerpos contra las leptospiras. Se han elaborado numerosos ensayos que se utilizan principalmente para la detección de infecciones recientes, para la selección de animales experimentales que se emplean en los estudios de infección y, en ganado vacuno, para planes sanitarios destinados a evaluar los niveles de infección por la serotipo Hardjo – a modo de pruebas en sangre o leche de animales determinados o como pruebas de leche de tanque. Los animales que han sido vacunados frente al serotipo pertinente pueden dar resultados positivos en algunos ELISA, dificultando de esta manera la interpretación de los resultados.

Requisitos para las vacunas: Las vacunas para uso veterinario son suspensiones de uno o más serotipos de *Leptospira* sp. inactivadas de tal forma que la actividad inmunógena se conserva. Aunque se ha probado una gama de vacunas experimentales basadas en extractos celulares, las vacunas comerciales son productos con células completas. Las leptospiras se cultivan en medios de cultivo adecuados que contienen a menudo suero o proteínas del suero. En caso de utilizarse, el suero y las proteínas del suero deben retirarse de los productos finales. Las vacunas pueden contener adyuvantes adecuados.

A. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad transmisible de los animales y del hombre producida por la infección por la espiroqueta *Leptospira*.

Agente patógeno causal: En el pasado, todas las leptospiras patógenas se clasificaban como miembros de la especie *Leptospira interrogans*; sin embargo, el género *Leptospira* ha sido reorganizado y se considera que consiste en 66 especies que se pueden clasificar en cuatro subclados. Las espiroquetas patógenas del género *Leptospira* pertenecen principalmente al subclado P1 de la nueva clasificación (Casanovas-Massana *et al.*, 2020; Vincent *et al.*, 2019). Serológicamente, hay más de 300 serovares leptospirales distintos reconocidos y estos están organizados en 30 serogrupos.

Teóricamente, cualquier *Leptospira* puede infectar a cualquier especie animal, pero afortunadamente, solo una pequeña cantidad de serotipos serán endémicos en cualquier zona o país. Además, la leptospirosis es una enfermedad que presenta una nidalidad natural, y cada serotipo tiende a mantenerse en hospedadores de mantenimiento específicos. Por lo tanto, en cualquier región una especie animal doméstica resultará infectada por serotipos mantenidos por una especie o serotipos mantenidos por otras especies animales presentes en la zona. La importancia relativa de estas infecciones accidentales se determina en función de la probabilidad de que factores sociales, de gestión y ambientales predominantes faciliten el contacto y la transmisión de leptospiras a partir de otras especies. Un ejemplo de infección mantenida en hospedador es la infección por el serotipo Hardjo en el ganado vacuno. El hecho de que existan pocos hospedadores permite el desarrollo de esquemas de control/erradicación.

Descripción de la enfermedad: El uso, la interpretación y el valor de los procedimientos de diagnóstico de laboratorio para la leptospirosis varían según la historia clínica del animal o del rebaño, la duración de la infección y el serotipo infectante. Debe sospecharse de leptospirosis aguda en los siguientes casos: aparición repentina de agalactia (en el ganado lechero adulto y ovino); ictericia y hemoglobinuria, especialmente en los animales jóvenes; meningitis; y fallo renal agudo (en perros). La leptospirosis crónica debe considerarse en los siguientes casos: aborto, mortinatos, nacimiento de animales débiles (pueden ser prematuros); infertilidad; fallo renal crónico (en perros); y casos de oftalmia periódica en los caballos. La localización y la persistencia de leptospiras en el riñón y en el tracto genital de los machos y las hembras son dos secuelas microbiológicas crónicas importantes de la infección por leptospiras que presentan problemas de diagnóstico concretos. Los animales infectados crónicamente pueden ser portadores durante toda la vida y servir de reservorios de la infección para otros animales y para los humanos.

Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad: *Leptospira* representa un riesgo moderado de infección humana. Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel apropiado de bioseguridad y biocontención, que vendrá determinado por un análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4. **Bioseguridad y bioprotección:** norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales.

Diagnóstico diferencial: 1) Pueden incluirse situaciones en las que se produce una caída de la producción de leche, como las infecciones víricas agudas y la ausencia repentina de agua de bebida; 2) enfermedades que cursen con insuficiencia hepato-renal, y 3) enfermedades caracterizadas por pérdida reproductiva – aborto, tamaños de camada reducidos, nacidos muertos e infertilidad, como por ejemplo, brucelosis, *Neospora*, fiebre Q y diarrea vírica bovina en el ganado vacuno; clamidiasis y toxoplasmosis en ovejas; fiebre Q en cabras, etc.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la leptospirosis y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente¹						
Aislamiento e identificación	–	+++	+	+++	–	–
PCR	–	++	–	++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
MAT	–	+++	+	++	+++	+
ELISA	+++	–	+++	+++	++	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero con limitaciones; + = puede utilizarse pero en muy pocas circunstancias; – = no adecuado para este propósito.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; MAT = prueba de aglutinación microscópica; ELISA = enzimoimmunoanálisis

1. Detección del agente

La demostración de la presencia de leptospiras en la sangre y la leche de los animales que muestran signos clínicos que sugieren leptospirosis aguda tiene un valor diagnóstico. Sin embargo, el aislamiento a partir de la sangre no es siempre satisfactorio, porque la bacteriemia es pasajera y no siempre se acompaña de síntomas clínicos. Con frecuencia, los perros se tratan con antibióticos antes de tomar las muestras para analizar la presencia de *Leptospira*, lo que después disminuye la probabilidad de identificar el agente en la sangre. También tiene valor diagnóstico la detección de una infección generalizada por *Leptospira* en una serie de órganos tomados en la necropsia. Sin embargo, si el animal vive lo suficiente o se le ha tratado con antibióticos, puede

1 Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en una misma muestra clínica.

resultar difícil la detección sistémica de microorganismos intactos; en estos casos la inmunohistoquímica puede ser particularmente útil en la identificación del antígeno residual de leptospiras. La demostración de la presencia de leptospiras en el tracto genital, los riñones o la orina solo debe interpretarse considerando en conjunto los síntomas clínicos y los resultados serológicos, ya que puede que estos hallazgos solo indiquen que el animal era portador.

La imposibilidad de detectar la presencia de leptospiras en la orina de un animal no es suficiente para descartar la posibilidad de que este sea portador renal crónico; solo indica que el animal no excretaba cantidades detectables de leptospiras en el momento del examen. La toma de orina después del tratamiento de los animales con un diurético aumenta las posibilidades de detectar el microorganismo. En los casos importantes en los que estén implicados animales aislados (por ejemplo, la autorización para que un caballo semental vuelva a utilizarse como reproductor), las pruebas negativas de muestras de orina de tres semanas consecutivas se considera una buena demostración de que el animal no elimina leptospiras por la orina.

La detección de las leptospiras en los líquidos corporales o en los órganos internos (normalmente en el riñón, el hígado, el pulmón, el cerebro o en las glándulas suprarrenales) de fetos abortados o nacidos muertos tiene valor diagnóstico de la leptospirosis crónica de la madre, y es una evidencia de la infección activa del feto.

1.1. Aislamiento de *Leptospira*

El aislamiento de leptospiras por personal experimentado es uno de los métodos más específicos de demostración de su presencia, siempre que no haya residuos de antibióticos, que no haya autólisis avanzada del tejido, que los tejidos se manejen con rapidez para realizar cultivos después de su recogida y, en el caso de la orina, que tenga un pH adecuado. Cabe señalar que la sensibilidad diagnóstica del aislamiento del agente es baja. Sin embargo, el método da acceso al laboratorio a la cepa aislada, lo que proporciona información importante sobre la epidemiología de la enfermedad, que luego puede usarse para mejorar el diagnóstico y la producción de vacunas contra *Leptospira*.

Si los tejidos o los líquidos no se pueden enviar al laboratorio inmediatamente para la realización de un cultivo de leptospiras, la muestra se conservará a 2–5°C para impedir el crecimiento excesivo de otras bacterias y la autólisis de las muestras de tejido. Como medios de transporte para el envío de las muestras, deben emplearse un medio de cultivo líquido o una solución al 1% de albúmina sérica bovina (BSA) con 5-fluorouracilo a una concentración de 100–200 µg/ml.

El cultivo debe realizarse en un medio líquido o semisólido (agar al 0,1–0,2%) con BSA o bien con Tween 80 (por ejemplo, medio EMJH²) o una combinación de Tween 80 y Tween 40 (Ellis, 1986). La contaminación se puede controlar añadiendo una serie de agentes selectivos, por ejemplo, 5-fluorouracilo, ácido nalidíxico, fosfomicina y una mezcla de rifampicina, polimixina, neomicina, 5-fluorouracilo, bacitracina y actidiona. Sin embargo, el uso de agentes selectivos puede reducir las posibilidades de aislamiento cuando solo haya un número pequeño de leptospiras viables, y algunas cepas de leptospiras no crecerán en los medios selectivos que contengan múltiples antibióticos. La adición de suero de conejo al 0,4–5% a un cultivo semisólido aumenta las posibilidades de aislar serotipos de leptospiras exigentes.

Los cultivos deben incubarse a una temperatura de 30 ± 2°C al menos durante 16 semanas y, preferiblemente, durante 26 semanas. El tiempo que se requiere para la detección de un cultivo positivo varía con el serotipo de *Leptospira* y el número de microorganismos presentes en la muestra. Los serotipos menos exigentes (por ejemplo, Pomona y Grippotyphosa) pueden dar resultados positivos muy pronto, entre 7–10 días después de la inoculación; otros serotipos (por ejemplo, Hardjo y Bratislava) pueden tardar mucho más tiempo. Los cultivos deben examinarse con un microscopio de campo oscuro cada 1–2 semanas. Es importante utilizar una fuente luminosa de 100 vatios y un microscopio de campo oscuro de buena calidad.

1.2. Técnicas de tinción inmunoquímicas

La presencia de leptospiras se puede poner de manifiesto también mediante una serie de técnicas de tinción inmunoquímicas, por ejemplo, la inmunofluorescencia y diversas técnicas inmunohistoquímicas. Estas técnicas son útiles para diagnosticar la infección en material patológico que es inadecuado para la realización de cultivos o donde se requiere un diagnóstico rápido. Puesto que el éxito de estas técnicas depende del número de microorganismos presentes, son menos apropiadas para diagnosticar el estado de portador crónico, donde el número de microorganismos puede ser muy bajo o localizado. Las leptospiras no se tiñen bien con los colorantes de anilina, y las técnicas de tinción argéntica carecen de sensibilidad y especificidad, aunque constituyen un complemento útil para el diagnóstico histopatológico.

2 EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

1.3. Métodos de detección del ácido nucleico

Las pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplean cada vez más para detectar leptospiras en tejidos y líquidos corporales de animales debido a la sensibilidad percibida y a la capacidad de dar un diagnóstico temprano. La PCR en tiempo real es más rápida que la PCR clásica y es menos sensible a la contaminación (Picardeau, 2013). Las pruebas se clasifican en dos posibles grupos en función de si se detectan los genes que están siempre presentes en la bacterias, como *gryB*, *rrs* (gen del ARNr de la subunidad 16S) y *secY*, o genes restringidos a especies patógenas de *Leptospira*, como *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA* y *ligB* (Thaipadunpanit *et al.*, 2011). Estas pruebas no identifican el serotipo infectante, aunque algunos grupos de cebadores pueden permitir un mayor grado de identificación, a nivel de especie o de cepa si se secuencian los amplicones de la PCR. Este segundo análisis no es un método de diagnóstico de rutina. Muchos de los conjuntos de cebadores de la PCR se han diseñado y evaluado para ser utilizados en muestras humanas y no animales, y no existe acuerdo general acerca de los cebadores de la PCR que deben utilizarse para analizar muestras de animales, aunque los que se indican más a menudo son los que se basan en el gen *lipL32*. La validación sigue siendo uno de los problemas por resolver en cuanto al uso de la PCR en el diagnóstico de la leptospirosis animal (véase la Tabla 1), y cada laboratorio es responsable de la validación de la prueba concreta que utilice para el tejido, líquido y especie analizados. Hasta ahora, solo se han validado tres PCR en tiempo real (Ahmed *et al.*, 2009; 2012b; Slack *et al.*, 2007; Thaipadunpanit *et al.*, 2011). La presencia en las muestras clínicas de inhibidores de la amplificación puede originar falsos negativos, especialmente en muestras de animales alteradas por la contaminación con heces o autólisis. El control de calidad de los ensayos de PCR utilizados para el diagnóstico de la leptospirosis requiere una atención especial en lo que se refiere al diseño y al volumen de trabajo del laboratorio para prevenir la contaminación de los materiales y al uso de muestras control apropiadas (McCreedy & Callawayth, 1993). Además, el procesamiento de la muestra para PCR es decisivo y debe ser adecuado para el tejido, el líquido y la especie que se esté analizando.

1.4. Identificación de cepas de *Leptospira*

La identificación de las cepas de leptospiras es un cometido de los laboratorios de referencia especializados. Para realizar una identificación completa, debe utilizarse una combinación de procedimientos que determinen: 1) si la cepa es un patógeno o un saprofito; 2) la especie de *Leptospira* a la que pertenece la cepa y 3) el serogrupo y el serotipo de la cepa. Un cultivo puro de leptospiras puede identificarse como perteneciente a una especie patógena o saprófita mediante pruebas diferentes como la capacidad de infectar animales, la resistencia relativa a la 8-azaguanina, la actividad lipasa, la tolerancia a la sal y a la temperatura, y el contenido de G+C del ADN.

La determinación de la especie se basa en análisis de hibridación ADN-ADN pero cada vez se utilizan más otras técnicas moleculares rápidas (Ahmed *et al.*, 2012a), entre las cuales la tipificación de la secuencia multilocus (MLST) (Ahmed *et al.*, 2006) y la secuenciación del gen *ppk* (Vincent *et al.*, 2019) parecen robustas. Las diferentes cepas pertenecientes a un único serotipo normalmente pertenecen a la misma especie, pero este no siempre es el caso.

El serogrupo de las cepas pertenecientes a *Leptospira* puede diferenciarse mediante reacciones de aglutinación cruzada (un concepto que ya no tiene validez taxonómica pero que es un paso preliminar útil en la identificación y selección del antígeno para vacunas y pruebas serológicas). La diferenciación del serotipo se realiza tradicionalmente mediante la absorción por aglutinación cruzada, aunque para la mayor parte de las cepas esto se realiza ahora utilizando métodos que requieren menos tiempo, como son los anticuerpos monoclonales (MAbs). Varios métodos moleculares pueden dar resultados que pueden concordar con la serotipificación. Estos métodos no son válidos para establecer nuevos serotipos, pero aportan una orientación útil en cuanto a la identificación y pueden aportar información epidemiológica molecular útil a nivel de sub-serotipo. Los enfoques basados en la PCR incluyen multilocus con un número variable de repeticiones en tándem (Slack *et al.*, 2006; Zuermer & Alt, 2009), amplificación de elementos de inserción, polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y AFLP fluorescente-marcada (Vijaychari *et al.*, 2004) PCR con cebado aleatorio. Se ha observado que el análisis del ADN un análisis de fragmentos de restricción (obtenidos por endonucleasa) del ADN bacteriano (BRENDA) es muy útil en estudios epidemiológicos de leptospiras de animales de producción.

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas constituyen el procedimiento de laboratorio utilizado con más frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico, para determinar la prevalencia en el rebaño y para realizar los estudios epidemiológicos. Los anticuerpos de las leptospiras aparecen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante

semanas o meses y, en algunos casos, años. Desafortunadamente, los títulos de anticuerpos puede que disminuyan hasta niveles indetectables mientras los animales permanecen infectados crónicamente. Para superar este problema, se necesitan métodos sensibles que detecten el microorganismo en la orina o en el tracto genital de portadores crónicos.

Se ha descrito una amplia variedad de pruebas serológicas que muestran grados variables de especificidad de serogrupo y de serotipo. La prueba de la aglutinación microscópica (MAT) y el enzoinmunoanálisis (ELISA) contribuyen al diagnóstico veterinario.

2.1. Prueba de aglutinación microscópica

La prueba MAT en la que se emplean antígenos vivos es la prueba serológica más ampliamente utilizada. Constituye la prueba de referencia frente a la que se evalúan todas las otras pruebas serológicas y se utiliza en las comprobaciones para la importación/exportación. Para obtener una sensibilidad óptima deben emplearse antígenos representativos de todos los serogrupos conocidos que existen en la región en la que se han encontrado los animales y, preferiblemente, cepas que representen a todos los serogrupos conocidos. La presencia de un serogrupo normalmente viene indicada por la reacción frecuente en la selección serológica pero solo puede identificarse definitivamente por el aislamiento de un serotipo procedente de animales afectados clínicamente. Se puede mejorar la sensibilidad de la prueba utilizando aislamientos locales en vez de cepas de referencia, pero las cepas de referencia ayudan en la interpretación de los resultados entre los laboratorios.

La especificidad de la MAT es buena; normalmente los anticuerpos frente a otras bacterias no dan reacción cruzada con *Leptospira* de manera significativa. Sin embargo, existen reacciones serológicas cruzadas significativas entre serotipos y serogrupos de *Leptospira* y es probable que un animal infectado con un serotipo tenga anticuerpos frente al serotipo infectante que dé una reacción cruzada con otros serotipos (normalmente a un nivel más bajo) en la MAT. Por tanto, la serología no puede utilizarse para identificar definitivamente la identidad del serotipo infectante en una infección individual o en un brote, y requiere el aislamiento del agente. Sin embargo, en áreas donde los serotipos de *Leptospira* presentes se han descrito bien mediante estudios de aislamiento, el examen serológico de los animales infectados puede sugerir, aunque no definitivamente identificar, el serotipo infectante. Además, los animales que han sido vacunados contra la leptospirosis pueden tener anticuerpos frente a los serotipos presentes en la vacuna utilizada. Por tanto, es especialmente importante considerar el historial de vacunación de los animales objeto de estudio. Los métodos para la realización de la prueba se han descrito detalladamente (Faine *et al.*, 2000; Goris & Hartskeerl, 2014; USDA, 1987).

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Las estirpes seleccionadas deben cultivarse en medio de cultivo líquido para leptospiras (como EMJH u otro medio adecuado) a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y el cultivo debe tener al menos 4 días, pero no más de 10 días y esto puede depender del crecimiento y la densidad de los cultivos. Como antígenos se utilizarán cultivos vivos con densidades de aproximadamente 2×10^8 leptospiras por ml. Para estandarizar la densidad del cultivo, puede ser necesario ajustar los cultivos a una concentración de 2×10^8 leptospiras por ml antes de la prueba. La densidad de los cultivos de *Leptospira* se puede determinar mediante: (1) recuento en una cámara de recuento adecuada (Helber o Petroff-Hausser, profundidad de celda de 0,02 mm), (2) midiendo la densidad óptica del cultivo mediante espectrofotometría a 420 nm, (3) utilizando la escala de McFarland, y (4) estimando el número de leptospiras por campo mediante microscopía de campo oscuro.
- ii) El número de antígenos que se utilizan es determinado, y se puede realizar una selección con una dilución del suero de 1/50 (o una dilución de inicio diferente basada en el objetivo de la prueba).
- iii) A cada pocillo se añade un volumen de cada antígeno, igual al volumen del suero diluido, para hacer una dilución final del suero de 1/100 en la prueba de selección.
- iv) Las placas de microtitulación se incuban a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1,5 –4 horas
- v) Las placas se examinan mediante microscopía de campo oscuro.

El título de punto final se define como la dilución de suero que muestra un 50% de aglutinación, dejando libres un 50% de las células en comparación con un cultivo control diluido a la mitad en solución salina tamponada con fosfato. El resultado de la prueba puede indicarse como el punto final de la dilución del suero (por ejemplo, como 1/100 o 1/400) o como un título que es el inverso de la dilución del punto final del suero (por ejemplo, 100 o 400).

2.1.2. Control de calidad de los antígenos que se utilizan en la MAT

La identidad de los antígenos es un factor crucial al realizar la MAT. Los antígenos deben evaluarse respecto a su identidad utilizando sueros hiperinmunes de conejo, MABs, o un método molecular que confirme los pases a lo largo del tiempo, preferiblemente cada vez que se realiza la prueba, pero al menos dos veces al año. El suero de conejo hiperinmune para este fin puede prepararse utilizando un protocolo como el ofrecido por la Subcomisión de Taxonomía de *Leptospira*. Brevemente, se seleccionan conejos sanos con un peso entre 3–4 kg que no tengan anticuerpos antileptospirosis detectables. A cada conejo se le administra una inoculación intravenosa de un cultivo vivo que haya crecido bien o de un cultivo tratado con formalina con una densidad aproximada de 2×10^8 leptospirosis/ml en una vena marginal de la oreja. Puede ser necesario incluir un paso de lavado, porque el BSA puede causar shock. El cultivo debe hacerse en medio de BSA con Tween 80 o en otro medio apropiado. Se administran cinco inoculaciones de 1, 2, 4, 6 y 6 ml a intervalos de 7 días. Una semana después de la última inoculación, se determina el título del anticuerpo homólogo mediante la MAT. Si el título es $\geq 1/12.800$, se anestesia el conejo y se sangra mediante punción cardíaca 7 días más tarde (es decir, 14 días después de la inyección final). Si el título es $< 1/12.800$, se puede administrar otra inoculación de 6 ml de cultivo; 7 días después de esta se determina de nuevo el título homólogo. El procedimiento debe repetirse con otro conejo a no ser que el título sea $\geq 1/12.800$. Para la preparación de cada antisuero se utilizan dos conejos. Si los títulos son satisfactorios en ambos conejos, los sueros se pueden mezclar. Para mantener la potencia es preferible liofilizar el antisuero en volúmenes de 2 ml y conservarlo a 2–5°C. Alternativamente, el suero se puede conservar en volúmenes de 1 ml a temperaturas de entre –15 y –70°C. Todas las inoculaciones a los animales deben ser aprobadas y realizadas conforme a las normas establecidas para el bienestar animal. Se pueden considerar otros protocolos de inmunización en función del uso previsto del antisuero y la necesidad de reducir el número de conejos utilizados.

Debe comprobarse de forma regular la pureza de los antígenos utilizados en la MAT mediante el cultivo en agar sangre y en caldo de tioglicolato. Los cultivos base de antígenos se pueden almacenar a temperaturas de entre –70°C y –80°C o en nitrógeno líquido. Después de la liofilización habrá una tasa de supervivencia baja de leptospirosis. El pase repetido de antígenos en medio de cultivo da lugar a una pérdida de antigenicidad. En este caso, se debe hacer un nuevo cultivo líquido a partir del cultivo base.

El esquema anual internacional de eficiencia de la MAT puede consultarse en la Sociedad Internacional de Leptospirosis³.

2.1.3. Interpretación y limitaciones de la MAT

Un título de 1/100 se considera positivo, pero dada la alta especificidad de la MAT, pueden tomarse títulos menores como indicio de exposición previa a *Leptospira*.

Como prueba en un animal aislado, la MAT es muy útil en el diagnóstico de la infección aguda; tiene valor diagnóstico la demostración de un aumento de cuatro veces en los títulos de anticuerpos en muestras pareadas de sueros, estando cada par formado por una muestra del animal con enfermedad aguda y una muestra del mismo animal una vez convaleciente. Además, un diagnóstico de leptospirosis puede basarse en el hallazgo de títulos muy elevados en un animal con un cuadro clínico bien definido. La prueba tiene limitaciones en la diagnosis de la infección crónica en animales individuales, tanto en el diagnóstico de abortos como en la identificación de portadores renales o genitales (Ellis, 1986). Esto es particularmente cierto en las infecciones por leptospirosis adaptadas al hospedador, como por ejemplo en la infección de ganado vacuno por el serotipo Hardjo. Cuando se toma como significativo un título de 1/100 o superior, la sensibilidad de la prueba solo es del 41%, e incluso cuando el título significativo mínimo se reduce a 1/10, la sensibilidad de la prueba solo es del 67% (Ellis, 1986). Sirve de diagnóstico la demostración de anticuerpos en la sangre fetal pero los títulos son con frecuencia muy bajos, es decir, 1/10, y se requiere un procedimiento modificado de la prueba en la mayoría de los laboratorios.

Puesto que la leptospirosis es un problema de rebaño, la MAT tiene un uso mucho mayor como prueba de rebaño. Para obtener información útil, se deben tomar muestras de al menos diez animales o del 10% del rebaño, la que mayor sea. En un estudio de la infección por Hardjo en el ganado vacuno, encontraron que normalmente una muestra de diez vacas indicaba la presencia o ausencia de infección en un rebaño. El incremento en el tamaño de la muestra

3 Disponible en: https://leptosociety.org/proficiency_testing

mejoraba notablemente la información epidemiológica, las investigaciones de la enfermedad clínica y los rastreos retrospectivos de salud pública.

Al hacer un diagnóstico serológico de la leptospirosis, deben tenerse muy en cuenta el serotipo infectante y el estado clínico implicado. En el caso del aborto inducido por el serotipo Pomona en el ganado vacuno, normalmente se encuentra un título alto en el momento del aborto, debido a que el incidente clínico tiene lugar relativamente pronto después de la infección. El aborto en el ganado vacuno debido al serotipo Hardjo es un hecho crónico; en este caso, la respuesta serológica en el momento del aborto es más variable, apareciendo algunos animales seronegativos y otros que muestran títulos altos. El ganado vacuno puede experimentar una caída en la producción de leche durante la fase aguda de la infección por Hardjo, y este síntoma clínico está asociado con títulos altos. También debe tenerse en cuenta el historial de vacunación al interpretar los resultados de la MAT, pues la vacunación extendida contribuye de forma importante al número de animales seropositivos y puede enmascarar la presencia de infecciones crónicas en el rebaño, en particular por el serotipo Hardjo.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

Los ELISA para la detección de anticuerpos antileptospira se han elaborado empleando una serie de preparaciones antigénicas diferentes, protocolos de ensayo y programas de ensayo que incluyen pruebas en placa y pruebas con tiras reactivas. Las preparaciones de antígeno han sido principalmente o bien preparaciones de células enteras o bien preparaciones de la proteína de la membrana externa (OMP), y recientemente se ha incidido especialmente en el desarrollo de pruebas en las que se utilizan OMP recombinantes. El agente utilizado es el que determina la especificidad del ELISA. Los ELISA basados en OMP recombinantes son ampliamente reactivos frente a anticuerpos contra todas las leptospirosis patógenas y por lo tanto no tienen valor en los estudios epidemiológicos. Por el contrario, los ELISA basados en antígenos lipopolisacáridos son específicos de serogrupo y sí tienen utilidad en los estudios epidemiológicos y los planes de control. Se ha observado que los ELISA que funcionan con IgM son útiles en el diagnóstico de la infección aguda. Un ELISA que funcione con todas las Ig es útil para identificar animales totalmente susceptibles, que serán adecuados para las pruebas de exposición experimental. También se han desarrollado ELISA para utilizarlos en leche de vacas concretas o en leche de tanque, con el fin de detectar anticuerpos contra el serotipo Hardjo. Estas pruebas han resultado útiles para identificar rebaños infectados por Hardjo y en programas de control/erradicación del serotipo Hardjo (Pritchard, 2001). No obstante, los rebaños que están vacunados contra el serotipo Hardjo también serán positivos en estos distintos ELISA, lo cual disminuye su utilidad en zonas en las que se vacuna por sistema. Todavía no se dispone ampliamente de pruebas basadas en OMP. Aunque pueden resultar útiles en el diagnóstico de infecciones puntuales, es improbable que resulten útiles en programas de control en el caso de las infecciones mantenidas por el hospedador, como las causadas por el serotipo Hardjo, en las cuales el ganado vacuno infectado de forma natural no produce respuesta frente a proteínas de la membrana externa, o bien esta es muy débil, sino que la principal respuesta serológica tiene lugar contra antígenos polisacáridos de la envoltura externa (Ellis *et al.*, 2000).

Los problemas con la validación son una importante limitación a la hora de evaluar la mayoría de ELISA. Casi todos se han validado frente a la MAT (empleando títulos de MAT de 1/100 o superiores), que es una prueba imperfecta y tiene una sensibilidad inferior al 50% en algunas infecciones crónicas. Los investigadores del ámbito de la medicina humana han intentado superar este problema utilizando modelos de clase latente bayesianos y metaanálisis de efectos aleatorios (Limmathurotsakul *et al.*, 2012; Signorini *et al.*, 2013), pero la mejor validación posible es utilizar sueros secuenciales de casos positivos según el cultivo (Goris *et al.*, 2012). Un pequeño número de ELISA para animales se ha validado empleando muestras de suero secuenciales de animales experimentales pero no después de 6 meses tras la exposición, mientras que un ELISA comercial para Hardjo se ha validado frente a muestras de suero únicas obtenidas de ganado vacuno positivo según el cultivo.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Las vacunas contra la leptospirosis para uso veterinario son suspensiones de una o más cepas patógenas de *Leptospira* inactivadas de tal manera que se conserva la actividad inmunógena. Las vacunas comerciales son productos que contienen células completas y están disponibles a nivel mundial para ganado vacuno, cerdos y perros. Las leptospirosis se cultivan en medios de cultivo apropiados, que pueden contener suero o proteínas del suero. En caso de utilizarse, el suero y las proteínas del suero deben eliminarse del producto final. Las vacunas pueden contener adyuvantes adecuados.

Las vacunas se utilizan en animales para proteger tanto a los animales como a las personas que con ellos contactan, y constituyen una herramienta clave en los programas de control o erradicación. Las vacunas no eliminarán la infección de un hospedador ya infectado y, por lo tanto, deben administrarse antes de la exposición. Las vacunas comerciales tienen varias eficacias. Se ha observado que varios productos monovalentes que se emplean en el ganado vacuno estimulan poco la inmunidad. Los programas de vacunación deben adaptarse a cada población en cuestión y a la eficacia del producto que se utilizará. Lo ideal es vacunar al ganado vacuno antes de la posible exposición, y a partir de ese momento con una frecuencia anual, programando la vacunación de tal modo que preceda a los periodos de mayor riesgo. Para que un programa de vacunación funcione, es necesario llevar a cabo estudios epidemiológicos en los que se evalúe la incidencia de los distintos serotipos de *Leptospira* en una población dada (Adler & de la Pena Moctezuma, 2010).

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se dan en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter genérico y pueden complementarse mediante requisitos nacionales o regionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Para la producción de vacunas es de suma importancia la selección adecuada de las cepas. La inmunidad inducida mediante la vacunación es en gran medida específica de serotipo. Una vacuna debe formularse para su uso en una especie concreta de animal de una región geográfica concreta. Solo debe contener aquellos serotipos – y preferentemente aquellos genotipos – que causen problemas en la especie animal, o que se transmitan de una especie animal a otra en la región. Las cepas seleccionadas para utilizarlas de cultivo de inóculo original deben clonarse en un medio sólido para asegurar la ausencia de contaminantes saprofitos de *Leptospira* y la uniformidad del cultivo.

Posteriormente, deben seleccionarse las cepas adecuadas por su capacidad para crecer con alto rendimiento en las condiciones de cultivo de lotes.

Cada cepa componente que se incluye en la vacuna final debe cultivarse por separado en medio líquido, preferiblemente en medio libre de proteínas o bajo en proteínas.

El volumen de cada cultivo de inóculo primario debe amplificarse mediante el crecimiento durante 2–10 días a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ en una serie de subcultivos hasta que se alcance un volumen suficiente para su uso como un cultivo de inóculo de producción. Los cultivos deben airearse y agitarse cuando sea necesario.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

En cada subcultivo del cultivo de inóculo original debe comprobarse su pureza y su crecimiento. La pureza puede comprobarse mediante la inoculación del contenido de un asa del cultivo en placas de agar sangre o en caldo de tioglicolato para su incubación a $35\text{--}37^\circ\text{C}$ durante 2–5 días, y mediante el examen de una extensión de precipitado del cultivo teñida con Gram. El crecimiento se puede examinar con un microscopio de campo oscuro. Para garantizar la pureza y la homogeneidad, cada cultivo de inóculo de producción también debe comprobarse frente a su antisuero de conejo homólogo. Los MAb también se pueden utilizar para este fin.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Hay una gran cantidad de información sobre la eficacia de las vacunas contra la leptospirosis. En la mayoría de los casos, las vacunas proporcionan una protección importante frente a la enfermedad producida por una infección homóloga en las condiciones naturales.

Las vacunas son menos eficaces en la prevención de la infección en animales, y un porcentaje de los animales vacunados se infectarán con el serotipo pertinente, y pueden eliminar el microorganismo en la orina a pesar de no presentar síntomas clínicos de la enfermedad.

Las pruebas de eficacia y la validación de vacunas deben llevarse a cabo en la especie a la que se destina la vacuna. La vacuna debe administrarse como se indica en la etiqueta, y debe comprobarse la inmunidad mediante la infección con cepas naturales virulentas de cada serotipo por las vías naturales de infección, es decir, mediante la infección conjuntival y/o

vaginal. Los estudios de validación se han llevado a cabo con frecuencia provocando la inmunidad mediante inoculaciones intravenosas o intramusculares de leptospiras. Las vacunas validadas de esta forma no siempre han ofrecido protección frente a la infección de campo, que tiene lugar por la exposición de las mucosas del ojo, la boca y el tracto genital a las leptospiras. Las vacunas comerciales contra la leptospirosis que contienen el serotipo Hardjo no siempre protegen al ganado de la infección conjuntival o de campo con el serotipo Hardjo. Se ha publicado un método para la comprobación de la eficacia de las vacunas con serotipo Hardjo que especifica el uso de vías de infección más naturales (monografía de la Farmacopea Europea).

2.2. Métodos de fabricación

2.2.1. Procedimiento

La producción se lleva a cabo mediante el cultivo de lotes en fermentadores de tamaño apropiado. Estos deben estar equipados con tomas para la adición estéril del cultivo de inóculo, aire y medio de cultivo. Deben contar también con tomas para el muestreo de forma que puedan supervisarse la pureza y el crecimiento del cultivo de producción.

Para la producción, se emplean preferentemente los medios bajos o libres de proteínas. Sin embargo, algunas cepas requieren la presencia de una proteína animal para alcanzar rendimientos adecuados; esta se suministra normalmente como BSA. Todos los componentes de los medios que no se degraden por el calor deben esterilizarse por calor. Esto reduce el riesgo de contaminación por las leptospiras saprofitas que lleva el agua, que no son eliminadas mediante la esterilización por filtración.

Después de la adición del cultivo de inóculo, se puede supervisar el crecimiento del cultivo de producción a intervalos frecuentes para comprobar cuándo empieza la fase logarítmica del crecimiento. Una vez detectada, entonces se agita y se airea el recipiente. El rendimiento final puede mejorarse con frecuencia mediante la adición de más Tween 80 al cultivo cuando se observe por primera vez la ralentización en el crecimiento logarítmico. Un crecimiento adecuado puede requerir hasta 10 días de incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

La inactivación se hace normalmente mediante la adición de formalina, pero también se ha utilizado el fenol, el mertiolato y la inactivación por calor; siempre deberá tenerse en cuenta la normativa de cada país.

Después de un periodo adecuado de inactivación, el cultivo puede concentrarse y el material proteico superfluo puede eliminarse mediante ultrafiltración. Después se pueden mezclar volúmenes iguales de las diferentes cepas que se van a incluir en la vacuna final y añadir el adyuvante y el conservante, si se considera oportuno.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Todos los productos de origen biológico, en concreto el BSA, deben proceder de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiformes transmisibles (véase el capítulo 1.1.8).

2.2.3. Control durante el proceso

Durante el proceso de producción, deben tomarse submuestras de forma diaria o dos veces al día y supervisar el crecimiento de las leptospiras y la ausencia de contaminantes. El crecimiento se supervisa contando leptospiras en una cámara de recuento en un microscopio de campo oscuro o mediante un nefelómetro. La ausencia de contaminación se puede establecer mediante el examen microscópico de preparaciones teñidas con tinción de Gram de un cultivo centrifugado.

Inmediatamente antes de la inactivación, debe tomarse una muestra para su comprobación frente a sus anticuerpos homólogos con una MAT. Debe comprobarse que el cultivo inactivado esté libre de leptospiras viables. Esto se lleva a cabo inoculando alícuotas de cultivo inactivado en un medio de crecimiento apropiado como el medio de Jonson & Harris, incubándolo a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 4 semanas y examinándolo semanalmente mediante microscopía de campo oscuro para detectar la presencia de leptospiras viables.

Después de realizar la mezcla, los niveles de agentes inactivantes libres, de minerales presentes en los adyuvantes (como el aluminio) y conservantes (como el tiomersal) deben estar dentro de los límites prescritos.

2.2.4. Control en lotes de producto final

i) Esterilidad

Las muestras seleccionadas de la vacuna completa deben examinarse para comprobar que no contienen bacterias u hongos viables (Farmacopea Europea, 2002a; 2002b; 9CFR 113.26). En el capítulo 1.1.9 pueden encontrarse las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.

ii) Identidad

Deben llevarse a cabo comprobaciones de la identidad en el producto antes de la inactivación; lo habitual es hacerlo con antisueros adecuados.

iii) Inocuidad

Debe comprobarse la inocuidad de muestras procedentes del producto acabado. Los métodos para realizar esto se han descrito en otro lugar (Farmacopea Europea, 2002a; 9CFR 113.26). La prueba debe llevarse a cabo para cada vía de inoculación indicada en la etiqueta y en dos animales sanos de cada categoría (por ejemplo, animales en gestación y en ganado joven) a los que va dirigida la vacuna. Los animales deben ser susceptibles a los serotipos contenidos en la vacuna y sus sueros deben estar libres de anticuerpos aglutinantes para esos serotipos. A cada animal se le administra la vacuna a través de la vía recomendada con el doble de la dosis recomendada, conforme se indica en la etiqueta. Los animales se observan durante 14 días y no deben mostrar efectos adversos locales o sistémicos atribuibles a la vacuna.

iv) Potencia del lote

Siempre que sea posible, debe evitarse el uso de pruebas de inocuidad en animales de las especies de destino o de laboratorio para la liberación del lote. Debe examinarse la potencia de las muestras de la vacuna completa en hámsteres o cobayas. La potencia se mide normalmente por la capacidad de la vacuna para impedir la muerte del animal cuando se exponga a dosis letales. Con algunos serotipos que no son letales para el hámster o el cobaya, como el serotipo Hardjo, la potencia se mide frente a la resistencia a la infección renal cuando los animales se infectan con 10 y 10.000 DI₅₀ (dosis infecciosa 50%) o mediante la inducción de un título de anticuerpos adecuado en conejos.

Un ejemplo de protocolo consiste en inocular un 1/40 de la dosis de perro de la vacuna a diez hámsteres sanos de no más de 3 meses. Después de 15–30 días, a cada hámster vacunado y a diez sin vacunar de la misma edad, se inocula intraperitonealmente una cantidad adecuada de un cultivo virulento de leptospiras del serotipo utilizado para elaborar la vacuna (o una suspensión de tejido de hígado o riñón tomado de un animal infectado experimentalmente). En el caso de las vacunas bivalentes, cada serotipo se examina por separado. Para que la vacuna supere la prueba, al menos el 80% de los controles debe morir mostrando los signos característicos de la infección por *Leptospira* y al menos un 80% de los animales vacunados deben permanecer con buena salud durante 14 días después de la muerte de los controles. Otros protocolos pueden ser aplicables a vacunas para ganado vacuno y porcino que contienen cinco o seis componentes. En la Farmacopea Europea se utilizan cinco animales vacunados y cinco animales control.

Se están elaborando pruebas *in-vitro* de potencia para las vacunas contra la leptospirosis basadas en la cuantificación del antígeno protector de la vacuna utilizando MAb en un ELISA de captura y actualmente se están empezando a utilizar (Klaasen *et al.*, 2013).

2.3. Requisitos para la aprobación para el registro

2.3.1. Proceso de fabricación

Para la aprobación de una vacuna, todos los datos relevantes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.1 y C.2.2) deben presentarse a las autoridades. Esta información debe proceder de tres lotes de vacuna consecutivos con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

En las pruebas se utilizan dosis únicas y dosis repetidas (teniendo en cuenta el número máximo de dosis para la vacunación primaria y, cuando corresponda, la primera revacunación/vacunación de refuerzo) que contienen la máxima carga permitida y, según cada caso, el máximo número de cepas vacunales.

i) Inocuidad general en la especie de destino

Un ejemplo es utilizar no menos de diez animales diana sanos que no tengan anticuerpos contra *Leptospira*. Se administra a cada animal una dosis doble de la vacuna mediante el método recomendado en la ficha técnica. Se observa a los animales cada día durante 14 días. Si se producen reacciones adversas atribuibles al producto biológico durante el periodo de observación, la vacuna resulta insatisfactoria. Si aparecen reacción adversas no atribuibles al producto biológico, la prueba será declarada inconcluyente y deberá repetirse (Farmacopea Europea, 2002a; 9CFR; Standard Requirements § 9. CFR, 113 del Departamento de Agricultura de EE.UU.).

ii) Inocuidad en animales gestantes

Si la vacuna va destinada a animales gestantes, se utilizan no menos de diez animales sanos en el estadio de gestación indicado por el programa recomendado o en distintos estadios de gestación. Se administra a cada animal una dosis doble de la vacuna mediante el método recomendado en la ficha técnica. Se observa a los animales por lo menos hasta 1 día después del parto. La vacuna supera la prueba si los animales no muestran reacciones locales o sistémicas anómalas, signos de enfermedad o mueren por motivos atribuibles al producto biológico y si no se detectan efectos adversos en la gestación o en las crías.

iii) Precauciones (peligros)

La vacuna debe clasificarse como inocua o patógena para el personal que la administra. Los fabricantes deben advertir adecuadamente de que es necesario acudir al médico en caso de auto-inyección (incluida la de adyuvantes, vacunas oleosas, conservantes, etc.) incluyendo advertencias en la ficha técnica o el prospecto del producto para que el personal que lo administre sea consciente de todos los peligros.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Para registrar una vacuna comercial, debe demostrarse la eficacia (protección) en un lote o lotes producidos de acuerdo con el método estándar y que contengan la cantidad mínima de antígeno o nivel de potencia; cada futuro lote comercial deberá analizarse antes de ser liberado para comprobar si tiene la misma potencia que se ha demostrado mediante el/los lote/s utilizado/s en la/s prueba/s de eficacia.

Un mínimo de diez animales vacunados y diez controles (en el caso del ganado vacuno) y un mínimo de ocho animales vacunados y ocho controles (en el caso de los perros) deberán exponerse a cada uno de los serotipos incluidos en la vacuna. Los animales deberán vacunarse según la propuesta de uso en la práctica. La exposición deberá tener lugar por una vía natural. Los animales deberán ser de una edad y encontrarse en un estado reproductivo acorde a todas las especificaciones que se pretenda incluir en la ficha técnica. Los animales deberán ser sacrificados (si no han muerto previamente) a los 28–35 días de la exposición y deberán tomarse muestras de los tejidos correspondientes para proceder al cultivo. Deberán realizarse exploraciones físicas a diario. Deberán realizarse cultivos de muestras de sangre los días 4-7 post-exposición y cualquier día que se detecte pirexia. La orina deberá examinarse para comprobar si contiene *Leptospira* 14, 21 y 28 días post-exposición. Tras el sacrificio deberá realizarse cultivo de riñón y de orina. Si en la ficha técnica va a incluirse la protección del tracto genital, tras el sacrificio también deberán realizarse cultivos de útero y de oviducto. En caso de que un animal muera, deberán realizarse cultivos de orina, riñón e hígado. Para incluir en la ficha técnica que el producto es eficaz, es necesario que un 80% de los animales vacunados resulte protegido y que al menos un 80% de los controles resulte infectado.

2.3.4. Duración de la inmunidad

La duración de la inmunidad debe determinarse en la especie animal a la que la vacuna está dirigida, empleando las vías naturales de infección. La duración de la inmunidad no debe estimarse en base a la duración de los títulos de la MAT en animales vacunados porque la

protección contra la enfermedad clínica puede existir con títulos muy bajos. La inmunidad vacunal debe persistir al menos durante 6 meses, dependiendo de la indicación de la etiqueta.

2.3.5. Estabilidad

Cuando las vacunas se almacenan en las condiciones prescritas, se espera que estas retengan su potencia durante 1–2 años. La estabilidad debe evaluarse mediante la determinación de la potencia después del almacenamiento a 2–5°C, a temperatura ambiente y a 35–37°C.

BIBLIOGRAFÍA

- ADLER B. & DE LA PEÑA MOCTEZUMA A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, **140**, 287–296.
- AHMED A., ENGELBERTS M.F.M., BOER K.R., AHMED N. & HARTSKEERL R.A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One*, **4**, e7093.
- AHMED A., GROBUSCH M.P., KLATSER P. & HARTSKEERL R.A. (2012a). Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *J. Bacteriol. Parasitol.*, **3**, 2 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.1000133>.
- AHMED A., KLAASEN H.L.B.M., VAN DER VEEN M., VAN DER LINDEN H., GORIS M.G.A. & HARTSKEERL R.A. (2012b). Evaluation of real-time PCR and culturing for the detection of leptospire in canine samples. *Adv. Microbiol.*, **2**, 162–170.
- AHMED N., MANJULATA DEVI S., VALVERDE M. DE LOS A., VIJAYACHARI P., MACHANG'U R.S., ELLIS W.A. & HARTSKEERL R.A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **5**, 28 (doi:10.1186/1476-0711-5-28).
- CASANOVAS-MASSANA A., HAMOND C., SANTOS L.A., DE OLIVEIRA D., HACKER K.P., BALASSIANO I., COSTA F., MEDEIROS M.A., REIS M.G., KO A.I. & WUNDER E.A. (2020). *Leptospira Yasudae* sp. and *Leptospira Stimsonii* sp. Nov., Two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**, 1450–1456. doi: 10.1099/ijsem.0.003480. PMID: 31184568.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (9CFR) United States Department of Agriculture Standard Requirements, 9 CFR 113.26.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (9CFR) United States Department of Agriculture Standard Requirements, 9 CFR 113.38.
- ELLIS W.A. (1986). The diagnosis of leptospirosis in farm animals. *In: The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*, Ellis W.A. & Little T.W.A., eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 13–31.
- ELLIS W.A., YAN K.T., MCDOWELL S.W.J., MACKIE D.P., POLLOCK J.M. & TAYLOR M.J. (2000). Immunity to Bovine Leptospirosis. *Proceedings of 21st World Buiatrics Congress, Punta del Este, Uruguay*, 10601–10611.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2002a). Monograph 01/2002:0447: *Leptospira* vaccine for veterinary use. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, p. 2270.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2002b). Chapter 2. Methods of analysis. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 13–231.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA MONOGRAPH: Bovine Leptospirosis vaccine (inactivated); PA/PH/Exp. 15V/T (01) 28.
- FAINE S., ADLER B., BOLIN C. & PEROLAT P. (2000). *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition. Medisci Press, Melbourne, Australia.
- GORIS M. & HARTSKEERL R. (2014) Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Curr. Protoc. Microbiol.*, **32**, Unit 12E.5.
- GORIS M., LEEFLANG M., BOER K., GOEIJENBIER M., VAN GORP E., WAGENAAR J. & HARTSKEERL R.A. (2012). Establishment of valid laboratory case definition for human Leptospirosis. *J. Bacteriol. Parasitol.*, **3**, e1000132
- KLAASEN H.L.B.M., VAN DER VEE M., MOLKENBOER M.J.C.H. & SUTTON D. (2013). A novel tetravalent *Leptospira* bacterin protects against infection and shedding following challenge in dogs. *Vet. Rec.*, **172**, 181–181.

LIMMATHUROTSAKUL D., TURNER E.L., WUTHIEKANUN V., THAIPADUNGPANIT J., SUPUTTAMONGKOL Y., CHIERAKUL W., SMYTHE L.D., DAY N.P.J., COOPER B. & PEACOCK S.J. (2012). Fool's gold: why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a re-evaluation of 5 diagnostic tests for Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.*, **55**, 322–331.

MCCREEDY B.J. & CALLAWAYTH H. (1993). Laboratory design and work flow. *In: Diagnostic Molecular Microbiology. Principals and Applications*, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.J., eds. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA, 149–159.

PICARDEAU M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine et Maladies Infectieuses*, **43**, 1–9.

PRITCHARD G. (2001). Milk antibody testing in cattle. *In Practice*, **23**, 542–548.

SIGNORINI M.L., LOTTERSBERGER J., TARABLA H.D. & VANASCO N.B. (2013) Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. *Epidemiol. Infection.*, **141**, 22–32.

SLACK A., SYMONDS M., DOHNT M.F. & SMYTHE L.D. (2006). An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. *J. Med. Microbiol.*, **55**, 1549–1557.

SLACK A., SYMONDS M., DOHNT M., HARRIS C., BROOKES D. & SMYTHE L. (2007). Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **57**, 361–366.

THAIPADUNGPANIT J., CHIERAKUL W., WUTHIEKANUN V., LIMMATHUROTSAKUL D., AMORNCHAI P., BOONSLIP S., SMYTHE L.D., LIMPAIBOON R., HOFFMASTER A.R., DAY N.P. J. & PEACOCK S.J. (2011). Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipI32 genes for human Leptospirosis in Thailand: a case-control study. *Plos One*, **6**, e16236.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE: NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (1987). Microtitre technique for detection of *Leptospira* antibodies. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **91**, 65–73.

VINCENT A.T., SCHIETTEKATTE O., GOARANT C., NEELA V.K., BERNET E., THIBEAUX R., ISMAIL N., KHALID M.K.N.M., AMRAN F., MASUZAWA T., NAKAO R., KORBA A.M., BOURHY P., VEYRIER F.J. & PICARDEAU M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neg. Trop. Dis.*, **13** (5), e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>

VIJAYACHARI P., HARTSKEERL R.A., SHARMA S., NATARAJASEENIVASAN K., ROY S., TERPSTRA W.J. & SEHGAL S.C. (2004). A unique strain of *Leptospira* isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in Andaman Islands: a proposal of serovar Portblairi of serogroup Sehgalii. *Epidemiol. Infect.*, **132**, 663–673.

WILD C.J., GREENLEE J.J., BOLIN C.A., BARNETT J.K., HAAKE D.A. & CHEVILLE N.F. (2002). An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospirosis antibodies on renal tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 20–24.

ZUERNER R.L. & ALT D.P. (2009). Variable nucleotide tandem-repeat analysis revealing a unique group of *Leptospira interrogans* serovar pomona isolates associated with California sea lions. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 1202–1205.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Leptospirosis (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la leptospirosis.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.