

Seroprevalencia de infección por *Leptospira spp.* en auxiliares y veterinarios de consultorios de pequeños animales de Villavicencio (Colombia)

Leptospira spp. infection seroprevalence in assistants and veterinarians working in small animal consulting rooms in Villavicencio (Colombia)

Helena Quitián¹, Julieth Parra¹, Agustín Góngora Orjuela¹, Jorge L. Parra Arango², Juan F. Gallego³, Luz H. Aponte Garzón⁴

Resumen

Objetivo: Determinar seroprevalencia por la prueba de MAT a seis serovares de *Leptospira spp.* en el grupo de riesgo: auxiliares y veterinarios de consultorios de pequeños animales de Villavicencio, Meta, Colombia, que previamente había sido serorreactor por Elisa-Pambio.

Materiales y métodos: Se tomaron 72 muestras de sueros de individuos pertenecientes al subgrupo de auxiliares y veterinarios, de una población mayor que incluía otros 7 grupos humanos a riesgo a *Leptospira spp.* y que había presentado reactividad serológica considerada como "positiva" (17 %) a la prueba de Elisa para *Leptospira spp.* con un kit de Pambio. Los sueros, que se habían conservado a -70°C en el Laboratorio de Reproducción y Genética Animal de la Universidad de los Llanos, fueron evaluados para reactividad serológica a la prueba de microaglutinación-lisis (MAT) con los serovares *L. hardjoprajitno*, *L. copenhageni*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. autumnalis*, *L. bratislava*, *L. australis* y *L. pomona*. Se utilizó el protocolo de laboratorio del Programa Nacional de Investigación en Salud Animal de CORPOICA-CEISA.

Resultados: La seropositividad a MAT fue 26.4%. En los auxiliares 21% y los veterinarios 29%. La seropositividad por serovar fue *L. bratislava* 24%, *L. australis* 8%, *L. copenhageni* 6%, *L. canicola* 3%, *L. autumnalis* y *L. hardjoprajitno* 1%. No se encontraron reactivos a *icterohaemorrhagiae* y *pomona*. Los títulos serológicos estuvieron en un rango entre 1:25 y 1:400. La copositividad entre MAT y ELISA IgM fue 42% y la conegatividad 77%.

Conclusiones: La seropositividad en el grupo estudiado es alta y preocupante, por lo tanto, exige extremar las medidas de bioseguridad durante la práctica médico veterinaria.

Palabras clave: *Leptospira*, prueba Elisa, estudios seroepidemiológicos, factores de riesgo (fuente: DeCS, BIREME).

¹ Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de los Llanos, Villavicencio (Colombia). centrovvet.elena@hotmail.com; agongora@unillanos.edu.co

² Corpoica-La Libertad. Villavicencio, Meta (Colombia). jparra@corpoica.org.co

³ Corpoica-Ceisa. Bogotá, D. C.

⁴ Programa de Enfermería. Universidad de los Llanos, Villavicencio (Colombia). lhaponte@unillanos.edu.co

Correspondencia: Universidad de los Llanos, Km. 12 vía Puerto López, Villavicencio, Meta (Colombia).

Fecha de recepción: 20 de enero de 2009
Fecha de aceptación: 4 de marzo de 2009

Abstract

Objective: *Determining to six serovares Leptospira spp. seroprevalence in assistants and veterinarians working in small animal consulting rooms in Villavicencio, Meta Colombia that previously had been seroreactor for Elisa-Pambio.*

Materials and Methods: *72 sera samples were taken from a subgroup of individuals consisting of assistants and veterinarians, in turn forming part of a larger population which included another 7 human groups at risk of becoming infected by Leptospira spp.; a cross-sectional epidemiological model was used and subjects were chosen by convenience. The sera had remained frozen (-70°C) in the Universidad de los Llanos Animal Reproduction and Genetics laboratory since being obtained. A commercial indirect ELISA kit (Pambio) was used for determining IgM antibodies. hardjoprajitno, copenhageni, canicola, icterohaemorrhagiae, autumnalis, bratislava, australis and pomona serovars were used in the microscopic agglutination test (MAT). The protocol of laboratory of the national program of investigation in animal health of CORPOICA-CEISA was used.*

Results: *MAT seropositivity was 26.4% (21% in assistants and 29% in veterinarians) Seropositivity by serovar was: 24% bratislava, 8% australis, 6% copenhageni, 3% canicola, 1% autumnalis and hardjoprajitno. No reactors to icterohaemorrhagiae and pomona were found. Serological titres ranged from 1:25 to 1:400.*

Conclusions: *It was thus concluded that seropositivity in the group being studied was high and worrying, meaning that biosafety measures must be maximized for all people working in veterinary practice.*

Keywords: *Leptospira, ELISA, sero-epidemiological study, risk factor (source: MeSH, NLM).*

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial (1). Actualmente es considerada una enfermedad reemergente en diversos países; sin embargo, a nivel del trópico y subtropical se reportan las mayores prevalencias debido a las condiciones ambientales que favorecen su transmisión (2,3). En humanos, la enfermedad presenta diversos cuadros que van desde formas subclínicas hasta síndromes altamente mortales. El diagnóstico es difícil ya que se confunde con otras enfermedades tropicales como el dengue, malaria, influenza u otras caracterizadas por signos clínicos inespecíficos de fiebre, dolor de cabeza y mialgias (4).

Se ha considerado tradicionalmente la leptospirosis como una enfermedad ocupacional, que afecta diversos grupos humanos como trabajadores de arrozales, ordeñadores, operarios de mataderos, de granjas porcícolas, militares y veterinarios (3); sin embargo, los casos sin riesgo ocupacional han venido aumentando (5), al igual que otros casos asociados con actividades deportivas y recreativas (6-8, 9,10).

El diagnóstico definitivo de la leptospirosis es el cultivo de la bacteria en medios selectivos a partir de sangre u orina durante la fase aguda de la infección, pero no es fácil y requiere tiempo; por tanto, las pruebas serológicas han surgido como una alternativa para establecer un diagnóstico rápido que permita instaurar un tratamiento oportuno (11).

La prueba de referencia es la microaglutinación-lisis (MAT) recomendada por la OMS, que detecta anticuerpos contra serovares específicos, con algunos limitantes como la

reacción cruzada entre algunos serovares, la necesidad de sueros pareados para confirmar una infección activa (11) y el apoyo de un laboratorio especializado para mantener las cepas vivas y libres de contaminación (12). Por su parte, la prueba Elisa permite un diagnóstico rápido y libre de los limitantes antes enunciados.

En Colombia, la leptospirosis no es de notificación obligatoria (13), lo que puede estar incidiendo en la baja notificación y diagnóstico en humanos, en contraste con las altas tasas de seropositividad encontradas en animales domésticos en diversas regiones (14). De otro lado, es escasa la importancia que se da a las infecciones zoonóticas y otros riesgos en los profesionales del sector agropecuario (15). De acuerdo con la OMS, deberían hacerse exámenes periódicos para enfermedades zoonóticas en varios grupos ocupacionales, incluidos los veterinarios.

En Holanda 102 veterinarios fueron examinados para *Streptococcus suis* tipo II, *Brucella abortus*, *Leptospira* y virus de la *coriomeningitis* linfocítica; se encontró una mayor seroconversión a *Streptococcus suis* (6%), *Brucella abortus* (4.9%) y *Leptospira* (3.9%) (16). En Estados Unidos se reporta una prevalencia entre 13.2% a 64.5% a infecciones zoonóticas en veterinarios (17). En Australia, 4% de los veterinarios reportaron haber adquirido una enfermedad zoonótica (18).

En Brasil, en el Hospital Veterinario de la Universidad Federal de Santa María (HV-UFSM), Rio Grande do Sul, se infectaron 37 personas con *Leptospira*, de las cuales 32 (85.5%) fueron serológicamente positivas y 5 (13.5%) presentaron un cuadro clínico compatible con la enfermedad (19). En Cuba, en la provincia de Ciego de Ávila

en una encuesta a 211 veterinarios sobre el nivel de conocimiento de las más importantes zoonosis, solo el 31% aprobaron el cuestionario; los niveles más bajos fueron en *leptospirosis* y *toxoplasmosis* (20). En Colombia no se tienen estudios poblacionales ni referentes bibliográficos para cuantificar y disminuir el riesgo de infecciones a enfermedades zoonóticas en profesionales y personal de apoyo que manipula animales domésticos o silvestres.

El objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia a *Leptospira spp.* mediante las pruebas de MAT y ELISA-IgM, en personal auxiliar y veterinarios de los consultorios veterinarios urbanos de Villavicencio y valorar la copositividad y conegatividad entre las dos pruebas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizaron 72 muestras del banco de sueros humanos del Laboratorio de Reproducción y Genética Animal de la Universidad de los Llanos, que pertenecían al subgrupo de riesgo ocupacional de auxiliares y veterinarios de los consultorios veterinarios urbanos de la ciudad de Villavicencio, Meta, Colombia, de un estudio desarrollado con anterioridad sobre leptospirosis en grupos ocupacionales de riesgo, donde la prueba serológica empleada fue un equipo o kit comercial ELISA-IgM® (21). Al momento de la toma de la muestra el grupo objetivo manifestó sentirse saludable y sin malestar. Se utilizó la información previa de las variables género, edad y actividad socioeconómica que había sido obtenida mediante entrevista, previo consentimiento informado.

PRUEBA DE MICROAGLUTINACIÓN-LISIS (MAT)

Luego se realizó la prueba siguiendo el protocolo para MAT del Laboratorio de Leptospira y Leptospirosis del Programa Nacional de Investigación en Salud Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA (Bogotá). Los sueros fueron probados en diluciones dobles a partir de 1:25 hasta techo final con los serovares *L. hardjoprajitno*, *L. copenhageni*, *L. canícola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. autumnalis*, *L. bratislava*, *L. australis*, *L. pomona*. Los serovares empleados como antígeno vivo correspondían a la batería clásica, con garantía de identidad genómica empleada en el mismo laboratorio. Se consideró dilución positiva aquella donde la lectura en el microscopio de campo oscuro presentó 50% o más de leptospirosis aglutinadas con respecto al control.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La asociación o independencia de las variables: veterinario, auxiliar de consultorio y género se determinó por una prueba de Chi cuadrado, así mismo la fuerza de la asociación por riesgo relativo. En el caso de los grupos de edad se corrió una tendencia lineal de proporciones (Epiinfo 3.3 2004).

RESULTADOS

De los 72 sueros analizados por MAT, 48 (66.6%) correspondieron a veterinarios y 24 (33.3 %) a personal auxiliar; 33 (46%) fueron mujeres y 39 (54%) hombres.

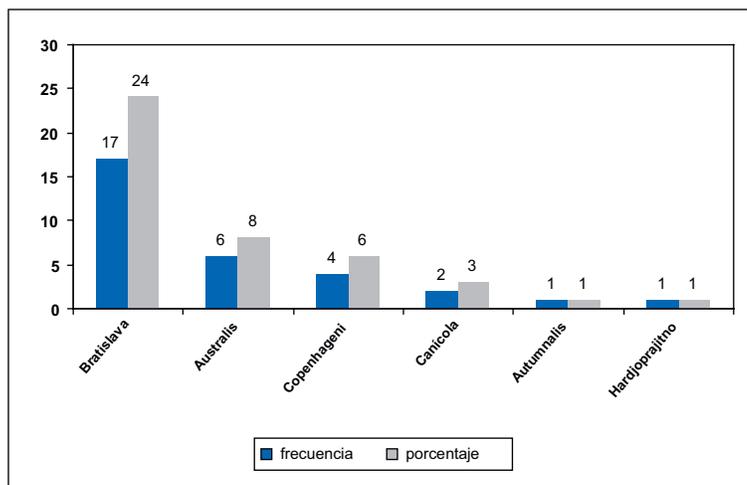


Figura 1. Frecuencias y proporción de sueros reactivos a seis serovares de *Leptospira* por MAT ($\geq 1:25$) en personal auxiliar y veterinarios, de consultorios urbanos de Villavicencio, Meta, Colombia.

El porcentaje general de reactivos a MAT para 1 o más serovares en dilución $\geq 1:25$ fue 26,4 % (19/72), de los cuales 29% (14/48) correspondió a veterinarios y 21% (5/24) al personal auxiliar. La distribución de reactivos por género fue de 30% para género femenino y 23% para género masculino. Ni la actividad en el consultorio (Ji^2 0.22; gl 1; $p > 0.10$) ni el género (Ji^2 0.18; gl 1; $p > 0.10$) se encontraron asociados al estatus de reactividad serológica a *Leptospira* spp. con MAT.

La edad promedio de la población fue de 33 años, y la reactividad serológica a MAT por grupos de edad fue: de 15-25 años 3/11 (27.2%), 26-35 años 9/39 (23.07%), 36-45 años 4/16 (25%) y 46-60 años 3/6 (50%). La tendencia lineal de proporciones no fue significativa para los grupos de edad (Ji^2 0.683 $p > 0.10$).

La seroprevalencia encontrada para cada uno de los serovares fue *L. bratislava* 24% tres veces superior al serovar *L. australis* 8%, cuatro veces más que *L. copenhageni* 6% y seis veces mayor que *L. canicola* 3%, *L. autumnalis* y *L. hardjoprajitno* 1%. No se

encontró reactividad positiva ($\geq 1:25$) a los serovares *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*. Figura 1.

Para las diluciones: 1:25, 1:50; 1:100, 1:200 y 1:400 la proporción de reactivos fue: 39%, 32%, 16%, 10% y 3%, respectivamente. El título más alto fue para *L. australis* en la dilución 1:400. Para el serovar *L. bratislava* la distribución porcentual de reactivos para las 4 primeras diluciones fue 1:25 53%, 1:50 29%, 1:100 6% y 1:200 12%.

DISCUSIÓN

La tasa de reactivos por MAT en este estudio (26,4%) es alta y superior a la reportada a nivel urbano en ciudades como Cali (23.3%) (22) y en población aparentemente sana a nivel del país (18.4%) (23) y en regiones del Perú (19%) (24), lo que confirma a los veterinarios y auxiliares de veterinaria como un grupo importante de riesgo a infección por *Leptospira* spp.

La mayor seroprevalencia de reactores en los veterinarios (26%) respecto a los auxiliares (21%), puede reflejar un mayor grado de exposición a las leptospiras, en razón de las actividades propias de la profesión; sin embargo, el análisis de riesgo relativo no demostró mayor riesgo en un grupo con respecto al otro.

La seropositividad que el grupo presentó al Elisa de Pambio, 17%, (21) con respecto a la reactividad general a los serovares por MAT (26.4%) fue significativamente inferior.

La prueba MAT detectó un mayor número de sueros positivos que coincide con estudios realizados en Vietnam, en pacientes febriles infectados por leptospira (25). En el Perú, utilizando el mismo kit de Elisa-Pambio, se observó una menor sensibilidad y la presencia de reacciones cruzadas (26); sin embargo, cuando se elaboró un kit Elisa que incluyó los seis serovares patógenos más prevalentes del mismo país, los resultados de la prueba fueron superiores, lo que sugiere que el uso de serovares locales aumentan la sensibilidad y especificidad de la misma (27). Esta misma estrategia podría ser objeto de valoración en Colombia, utilizando los serovares más prevalentes para las diferentes regiones.

En otras investigaciones, utilizando el kit Elisa Pambio, se encontró una alta sensibilidad y especificidad frente a otras pruebas serológicas, por lo que se recomienda su uso en etapas tempranas de la infección (28, 29). Contrariamente, se ha sugerido su uso como prueba tamiz y que se mantenga la prueba MAT como confirmatoria (27).

A pesar de las múltiples ventajas que presentan las pruebas de Elisa, se cree que la

alta variabilidad en los resultados es el resultado de la preparación de antígenos elaborados con la leptospira completa; cuando estos antígenos fueron reemplazados por antígenos recombinantes, se simplificó la producción y estandarización de la prueba obteniendo mejores resultados (30).

Aunque la edad no fue un importante factor de riesgo, el mayor número de reactores correspondió a aquellos en los cuales se ubica la mayor población económicamente activa, que coincide con estudios previos (26); aunque no se han estimado las pérdidas económicas, por efecto de incapacidad médica, estas podrían ser considerables y deben ser objeto de nuevos estudios.

Estos resultados también pueden revelar las características propias de la prueba, ya que el ELISA-IgM detecta IgM. Se conoce que una vez la *Leptospira* llega al torrente sanguíneo, se desencadena la respuesta inmune con la secreción de IgM, 4 a 7 días después de la infección (31); posteriormente aparecen los anticuerpos neutralizantes IgG, los cuales aumentan de forma progresiva desde el día 15 postinfección hasta los dos meses, cuando inician un lento descenso a niveles basales que pueden persistir por años (32). A medida que la concentración de IgG aumenta, la IgM disminuye; así es por lo que IgG con mayor frecuencia se detecta por la prueba de MAT.

La reactividad serológica en 6 de los 8 serovares probados por MAT sugiere la presencia de reacciones cruzadas (33) o la infectividad compartida de los diferentes serovares de leptospira. La mayor reacción al serovar *L. bratislava* podría indicar una mayor exposición a los principales reservorios de este serovar (porcinos y equinos), distinto del

serovar *L. canícola*, que se suponía podría tener un mayor contacto con los veterinarios y sus auxiliares en los consultorios, ya que los perros son la especie dominante de consulta urbana veterinaria en Colombia.

La mayor reactividad al serovar *L. bratislava* requeriría una evaluación sobre la infección y el rastro serológico en caninos. Así por ejemplo, en Long Island, Nueva York (1996), los casos de leptospirosis en caninos provinieron de infecciones por *L. grippityphosa* y *L. pomona* (34).

El serovar *L. bratislava* ha sido reportado como el más prevalente en otros países (35) que coincide con estudios a nivel local en grupos humanos y de animales (36,37). Dentro de la transmisión de la leptospira no se deben subestimar otras fuentes de infección, como el contacto con aguas estancadas, ya que se conoce que la mayoría de las especies patógenas pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo en este ambiente. En Villavicencio, son frecuentes las inundaciones en la época de lluvias, las cuales podrían vehicular la leptospira, aunque se desconoce la presentación de brotes epidémicos por esta causa.

La baja prevalencia al serovar *L. canícola* encontrada en este estudio, ha sido observada también en países europeos desde cuando la vacunación se empezó a utilizar ampliamente (38). En Colombia, esta medida se viene utilizando dentro de los planes de prevención a leptospira por parte de los propietarios de los caninos y posiblemente expliquen el bajo número de reactores a este serovar.

Sin ser objetivo del estudio ni tener la cuantía de muestras, sólo con la capacidad de discernir sobre sensibilidad, especificidad y

concordancia entre el MAT y el Elisa Pambio se notó una débil concordancia entre MAT y Elisa IgM medido a través del parámetro de Kappa; descontando al factor azar, puede ser atribuido a la presencia de otros serovares en el kit de Elisa IgM que no fueron los mismos utilizados en la prueba MAT; por tanto, Elisa es una prueba de género específico, mientras MAT es serovar específico.

Se concluye que la seroprevalencia general por MAT en el grupo de médicos veterinarios y auxiliares de veterinaria de los consultorios de la ciudad de Villavicencio es alta y en particular resalta la serorreactividad dominante al serovar *L. bratislava*, que no es especie específico de los caninos, y que deberá evaluarse su trasegar epidemiológico en la cadena de difusión de la Leptospira.

Conflicto de intereses: ninguno.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana (IIOC) y la Secretaria Municipal de Salud, por el apoyo financiero. También, a todos los veterinarios y auxiliares que participaron en forma voluntaria de este estudio.

REFERENCIAS

1. Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, Haake DA. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: Relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun* 2007;75:2864-2874.
2. Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson Jr. WD, Riley LW, et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 1999;354:820-825.

3. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Díaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:757-771.
4. Tappero JW, et al. *Leptospira* species (leptospirosis). In: G.L. Mandell, J. E. Bennett and R. Dolin, editores *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 2495-2501.
5. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Muller P, Kaslow DC. Sporadic urban Leptospirosis 1996;125:794-798.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of leptospirosis among white-water rafters- Costa Rica. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1977; 46(25):577-579.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in triathlons_ Wisconsin and Illinois, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1998; 47(28):585-588.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of acute febrile illness among participants in EcoChallenge Sabah 2000-Malaysia. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2000; 49(36):816-817.
9. St John MA, King S, Bullen SE, Cherian J, Levett PN. Leptospirosis occurring in two children after fresh water immersion. *West Indian Med J* 2000;49:340-43.
10. Narita M, Fujitani S, Haake DA, Patterson DL. Leptospirosis after recreational exposure to water in the yaeyama islands, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73(4):652-656.
11. Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Microbiol. Methods* 2006; 65:247-257.
12. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296-326.
13. Ochoa JE, Sánchez A, Ruiz I. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J PublicHealth* 2000;7(5):325-331.
14. Góngora A. Leptospirosis bovina, efectos sobre la reproducción e impacto económico, estudios en Colombia. En: *Memorias I Seminario Nacional de Sanidad Bovina*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 2008 sep. 20-21.
15. Cediell B, Natalia M, Villamil LC. Riesgo biológico ocupacional en la medicina veterinaria, área de intervención prioritaria. *Rev. Salud Pública* 2004;6(1):28-43.
16. Elbers A, Diepersloot R, Vecht U, Wisselink H, Tielen M. Occupational exposure to *Streptococcus suis* II, Hantavirus, *Brucella abortus*, Lymphocyte choriomeningitis virus, and leptospira in veterinarians and pig farmers in the southern Netherlands. *Epidemiol. Santé Anim.* 1997;31-32.
17. Hill D, Langley R, Morrow M. Occupational Injuries and illnesses reported by zoo veterinarians in the United States. *Journal of zoo and wildlife medicine* 1998;29 (4):371-385.
18. Weese JS, Peregrine AS, Armstrong J. Occupational health and safety in small animal veterinary practice: Part I - Nonparasitic zoonotic diseases *Can Vet J.* 2002;43:631-636.
19. Carneiro M, Giacomini M, Costa JM. Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: estudio clínico y epidemiológico. *Rev Chil Infect.* 2004;21(4):339-344.
20. Suárez-Hernández M, Llorens-Blanco F, Cepero-Rodríguez O, Retureta-Milian M, González-Martí T. Conocimientos que tienen médicos veterinarios no vinculados a la salud pública en la provincia Ciego de Ávila, Cuba sobre algunas zoonosis. *Rev Biomed.* 2005;16:221-226.
21. Díaz L, Zapata N, Góngora A, Parra JL, Gómez L. Determinación de anticuerpos a leptospira por la técnica de ELISA en siete grupos humanos de alto riesgo ocupacional en el municipio de Villavicencio. *Rev Col Cienc. Pec.* 2005;18(4):371.
22. Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. Seroprevalencia de infección por leptospira en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomédica* 2006;26:250-257.

23. Sebek Z, Sixl W, Valova M. Serological investigations for leptospirosis in humans in Colombia. *Geogr Med.* 1989;35:51-60.
24. Oficina General de Epidemiología-Instituto Nacional de Salud. Leptospirosis. Módulos Técnicos Serie Documentos Monográficos no. 2 Lima (Perú); 2000.
25. Blacksell SD, Smythe L, Phetsouvanh R, Dohnt M, Hartskeerl R, Symonds M, et al. Limited Diagnostic Capacities of Two Commercial Assays for the Detection of *Leptospira* Immunoglobulin M Antibodies in Laos. *Clin Diagn Lab Immunol* 2006;13:1166-1169.
26. Céspedes MZ, Balda LJ, González D, Tapia R. Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 2006;23(1):56-66.
27. Céspedes ZM, Glennly MA, Felices VA, Balda LJ, Suárez VM. Prueba de Elisa indirecta para la detección de anticuerpos Ig M para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 2002;19(1):24-27.
28. Levett PN, Branch SL. Evaluation Of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Methods For Detection Of Immunoglobulin M Antibodies In Acute Leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;66(6):745-748.
29. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41(2):803-809.
30. Flannery BL. Urban epidemics of leptospirosis in Salvador, Brasil (Tesis Ph.D.) University of California, Berkeley. 2002.
31. Hathaway S, Blackmore D. Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospire of the Ballum serogroup in the black rat (*Rattus rattus*) and the brown rat (*Rattus norvegicus*) in New Zealand. *J. Hyg. Camb.* 1981;87:427-436.
32. Tizar IR. *Inmunología Veterinaria* 6ª. ed. Mc Graw-Hill Interamericana Editores S. A. de C.V.;2002.
33. Kelson JS, Adler B, Chapman AJ, Faine S. Identification of leptospiral flagellar antigens by gel electrophoresis and immunoblotting. *J Med Microbiol* 1988;26(1):47-53.
34. McDonough P. Leptospirosis en caninos - estado actual. Department of Population Medicine and Diagnostic Science, Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Cornell University, New York, USA. 2001. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/Infect_
35. Céspedes ZM, Fernández CR, Rimarachin DR, et al. Leptospirosis: una enfermedad zoonótica hiperendémica en la provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública* 2004;21(2):62-70.
36. Morales-Cabezas RJ, Bravo-Tamayo D, Moreno-Velásquez D, Góngora A, Ocampo, A. Asociación serológica de la infección por leptospira en humanos, porcinos y roedores en una granja de Villavicencio, Colombia. *Orinoquia* 2007;11(2):73-80.
37. Góngora A, Parra JL, Aponte LH, Gómez LA. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en grupos de población de Villavicencio, Colombia. *Rev. Salud Pública* 2008; 10(2):269-278.
38. André-Fontaine G. Canine leptospirosis-Do we have a problem? *Veterinary Microbiology* 2006;177(1):19-24.