

Prevalencia de anticuerpos a diferentes serovares de *Leptospira interrogans* en caninos del municipio Boyeros, La Habana, Cuba

Prevalence of antibodies against different serovars of *Leptospira interrogans* in canines in Boyeros municipality, Havana, Cuba

Nicolás Andrés Rojas-Hoyos¹, Mario Márquez-Álvarez^{2✉}, Duniel Pino-Rodríguez², Mitchell Torres González-Chávez², Yaritza Cuba-Romero³, Noemí Gainza-Santos³

¹ Médico Veterinario Zootecnista, Colombia.

² Departamento de Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Mayabeque, Cuba.

³ Grupo Empresarial LABIOFAM, Cuba.

RESUMEN: Para determinar la prevalencia de anticuerpos contra algunos serovares de *Leptospira interrogans* se tomaron muestras de sangre a 160 perros mayores de un año del municipio Boyeros, la Habana, Cuba. Las muestras colectadas se centrifugaron a 1350 g durante 10 minutos y los sueros obtenidos se conservaron en viales a -20°C. Para la detección de anticuerpos específicos contra *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. ballum*, *L. australis* y *L. hebdomadis* se empleó una prueba de Microaglutinación Lenta en Placa. Se consideraron positivas las muestras que reaccionaron frente a seis unidades de antígeno, de al menos una de las cepas de *Leptospira* spp. evaluadas, a partir de la dilución 1:100. La seroprevalencia se determinó mediante un estudio epidemiológico observacional de tipo transversal, con el uso de datos de estimación de la población del municipio. Se obtuvo un valor de seroprevalencia total de 63,1 % (101/160) contra uno o más serovares; resultó más frecuente *L. icterohaemorrhagiae* con 58,8 % (94/160), seguido de *L. canicola* con 47,5 % (76/160), *L. ballum* 22,5 % (36/160), *L. pomona* 18,1 % (29/160), *L. australis* 10 % (16/160) y *L. hebdomadis* 7,5 % (12/160). Este estudio demostró una alta seroprevalencia en la población canina estudiada, lo que indica una exposición previa al agente y una amplia circulación de este.

Palabras clave: *Leptospira*, seroprevalencia, perros, aglutinación, zoonosis.

ABSTRACT: In order to determine the prevalence of antibodies against some *Leptospira interrogans* serovars, blood samples were taken from 160 dogs older than a year. This study was carried out in Boyeros municipality, Havana, Cuba. The samples collected were centrifuged at 1350 g for 10 minutes and the sera obtained were stored in vials at -20°C. For the laboratory evaluation, a slow plate agglutination test was used for the detection of specific antibodies against *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. ballum*, *L. australis*, and *L. hebdomadis*. The samples that reacted against six antigen units of at least one strain of *Leptospira* spp. evaluated, from the 1: 100 dilution, were positive. Seroprevalence was determined by a cross-sectional observational epidemiological study, using the population estimation data. A total seroprevalence value of 63,1 % (101/160) was obtained against one or more serovars, with *L. icterohaemorrhagiae*, being more frequent with 58,8 % (94/160), followed by *L. canicola* with 47,5 % (76/160) *L. ballum* 22,5 % (36/160), *L. pomona* 18,1 % (29/160), *L. australis* 10 % (16/160), and *L. hebdomadis* 7,5 % (12/160). This study demonstrated a high seroprevalence

✉ Autor para correspondencia: Mario Márquez-Álvarez. E-mail: mario60@unah.edu.cu

Recibido: 13/12/2016

Aceptado: 13/2/2017

in the canine population studied, which indicated a previous exposure to the agent and its wide spread.

Key words: *Leptospira*, seroprevalence, dogs, agglutination, zoonosis.

INTRODUCCIÓN

Según científicos e investigadores de las diferentes áreas de la ciencia, así como las organizaciones mundiales (FAO, OPS y OMS), la leptospirosis se define como una importante zoonosis endémica, reemergente y de distribución universal, causada por espiroquetas del género *Leptospira interrogans*. Su presentación es ocasionalmente epidémica, principalmente en regiones tropicales y subtropicales (1,2,3,4).

En 1852, Hofer describe una enfermedad de los perros antes desconocida, a la que llamó *Tyfus Seu Febris Nervosa Canum*; luego Keff, en 1898, la denomina enfermedad de los perros de Stuttgart (5,6).

Los aspectos sociodemográficos, los hábitos, las condiciones físicas y de saneamiento de la vivienda, el hacinamiento, la presencia y el control de roedores, la tenencia de mascotas y la presencia de animales silvestres son factores ampliamente reconocidos como condicionantes para la presentación de la leptospirosis a nivel mundial (7,8).

La tenencia y la cría de diferentes especies de animales de granja generan la infección por *Leptospira* spp. de animal a animal, y estos pueden ser infectados por los perros a través de aguas contaminadas u otras vías (9).

Resulta difícil conocer o acceder a información acerca de la incidencia de la enfermedad a nivel mundial, tanto en humanos como en animales, debido a que muchos países no cuentan con sistemas de vigilancia y estadísticas establecidos sobre el tema (10,11).

El incremento en el número de mascotas, dentro y fuera de los hogares, y su estrecha relación con las personas, unido a la escasa información sobre los riesgos potenciales que implica esta convivencia, hace que aumente de manera significativa la posibilidad de contraer

enfermedades de carácter zoonótico, entre las que se encuentra la leptospirosis (12).

Se conoce que la cantidad de serovares de *Leptospira* spp. identificados aumenta constantemente, por tanto, constituye una amenaza para la salud de los animales y el hombre. El monitoreo permanente del estado y cambio de la estructura etiológica de la leptospirosis en cada región debe ser una condición obligatoria para la lucha exitosa contra la enfermedad (9).

La presencia de animales seropositivos sin antecedentes de vacunación contra la enfermedad confirma la exposición previa al agente y su circulación en un área determinada; esto representa un riesgo potencial para la salud animal y humana, pues se conoce que la condición del hombre como hospedero accidental de todos los serovares patógenos lo convierte en una especie susceptible al desarrollo de un cuadro clínico grave de la enfermedad, la cual constituye una zoonosis de notificación obligatoria en cada país (6,12).

No se cuenta con datos ni referencias en la literatura consultada sobre estudios que reflejen la prevalencia de anticuerpos específicos contra diferentes serovares de *Leptospira* spp. en perros del municipio Boyeros, provincia La Habana, Cuba, por lo que este estudio permitiría determinar la seroprevalencia de la enfermedad en esta especie e identificar algunos de los serovares que circulan en la zona que, por sus características semirurales, reúne las condiciones ideales para la supervivencia del agente en el medio. En consecuencia, este análisis podría contribuir con la predicción del riesgo de exposición al agente, constituir una alerta temprana sobre posibles brotes epidémicos y servir como herramienta para establecer medidas de prevención y control encaminadas a preservar la salud, tanto de animales susceptibles como del hombre (13).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La investigación se realizó en el municipio Boyeros, provincia La Habana, Cuba, situado entre los 23°0'26"N y los 82°24'6"O. Este municipio tiene una extensión territorial de 134,2 km², una población de 188.474 habitantes (14) y una razón de un canino por cada 3.2 personas^A.

Selección de la muestra (n)

Para la selección de la muestra se realizó un muestreo estratificado por conglomerados en un estadio (15), para lo que se escogieron al azar una o varias manzanas de cada uno de los consejos populares del municipio Boyeros y se entrevistó una persona adulta de cada vivienda que se encontró abierta en el momento de la entrevista. Se tomaron datos del ciento por ciento de los animales que cumplieron con los criterios de inclusión. Para ubicar las manzanas de cada consejo popular nos apoyamos en un mapa del municipio tomado de la dirección municipal de la vivienda del municipio.

Tamaño de la muestra

Se calculó teniendo en cuenta la población de perros con dueño; para ello se utilizó una seroprevalencia estimada del 50 %, con 95 % de confianza y una precisión absoluta del 8 %,

con el empleo del software Epidat 3.1 (16). En estas condiciones el tamaño de la muestra estimada fue de 150 perros y se estudiaron 160 animales distribuidos en los siete consejos populares del municipio, como se describe en la [Tabla 1](#).

Criterio de inclusión de los animales

Se estudiaron perros pertenecientes a propietarios particulares residentes en el municipio Boyeros, que cumplieron como condiciones tener más de un año de edad, no haber recibido nunca una vacunación contra leptospirosis y no presentar un cuadro clínico compatible con la enfermedad.

Toma de muestras

Se extrajeron 5 ml de sangre por punción de la vena yugular y se colectaron en tubos sin anticoagulante. Después de reposar durante dos horas a temperatura ambiente, se centrifugaron a 1350 gravedades durante 10 minutos. Los sueros obtenidos se envasaron en viales de Eppendorf de 1,5 ml previamente identificados y se mantuvieron a -20°C hasta el día del ensayo. Se dejaron descongelar y se analizaron una vez que alcanzaron la temperatura de laboratorio, según el manual de recogida y toma de muestras para el diagnóstico de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (11).

TABLA 1. Muestra probabilística estratificada por consejo popular del municipio./*Stratified probabilistic sample per popular council of the municipality.*

Consejo popular	Población de perros con dueño (fh) = 0.00258	Muestra	Perros muestreados
Armada	7140	18	21
Calabazar	10305	26	29
Nuevo Santiago	8908	23	23
Santiago de las Vegas	7990	21	22
Boyeros	9291	24	25
Wajay	8361	22	22
Altahabana	6114	16	18
Municipio	N= 57992	n= 150	160

(fh) fracción constante

^A Duniel Pino-Rodríguez. Comunicación personal. 2017

Procesamiento de las muestras

Para la detección de anticuerpos específicos contra diferentes serovares de *L. interrogans*, las muestras se evaluaron utilizando una Prueba de Microaglutinación Lenta en Placa (MAT) (11), donde se usaron como antígenos los cultivos de leptospira con densidades aproximadas de 2×10^8 leptospiras por ml. Se utilizaron seis unidades de antígenos, con una dilución inicial de 1/50. Las placas de microaglutinación se incubaron y se examinaron mediante microscopía de campo oscuro. El título se definió como la dilución de suero que mostró 50 % de aglutinación, en comparación con un cultivo control diluido 1/2 en tampón fosfato salino; como el punto final se determinó una dilución del suero de 1/400 y se consideraron positivos aquellos animales con títulos $\geq 1/100$. Los sueros se enfrentaron a antígenos purificados de los siguientes serovares:

- *L. canicola*
- *L. icterohaemorrhagiae*
- *L. pomona*
- *L. ballum*
- *L. australis*
- *L. hebdomadis*

Tipo de estudio

Para el análisis epidemiológico se realizó un estudio observacional de tipo transversal, con el que se elaboraron tablas de distribución de frecuencia y se calculó la seroprevalencia general con un intervalo de confianza del 95 %, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia general contra uno o más serovares de *Leptospira* spp. en la población de animales estudiados fue de 63,1 % (IC 95 %: 55,5 - 70,6 %), lo que indica que estuvieron en contacto con al menos uno de los serovares analizados.

Este valor se consideró muy alto, lo cual evidenció una elevada circulación del agente en

el área. Otros estudios transversales en Cuba refieren valores inferiores: una investigación realizada con perros de un área de recogida de animales callejeros en la provincia Mayabeque, en el año 2010, informó valores de seroprevalencia de 36,3 % utilizando como método de diagnóstico una prueba de ELISA indirecta y MAT (17). Resultados similares (34,9 %) de seroprevalencia en canes se observaron en las provincias centrales del país, en un estudio realizado en 2014 con perros callejeros y con dueños (18).

De igual forma se reportan valores inferiores para los países de América Latina y el Caribe, con seroprevalencias que oscilan entre 4,9 % y 73,3 % (10); estudios realizados en Chile refieren valores de 21,3 % (85/400) (19), Argentina 33 % (37/110) y 41 % (81/197) en Cali, Colombia (20,21,22).

Se considera que las características observadas en la zona de muestreo influyeron de forma decisiva en los altos valores encontrados, pues existen numerosas áreas de concentración de basura doméstica y residuos de alimentos, que constituyen una fuente de alimentación y crean las condiciones adecuadas para la multiplicación de vectores (3,5); muchos de ellos son hospederos reservorios de algunos serovares de *Leptospira* spp.

Se conoce que la inmunidad contra la enfermedad es serovar específica y que su duración es relativamente corta después de la exposición del agente al sistema inmune (23); por lo que se puede asegurar que el contacto agente-animal ocurrió recientemente.

Es típico que en Cuba las mascotas tengan una relación estrecha con sus propietarios, lo que confiere especial importancia al contacto de los perros con agentes patógenos como las leptospiras, debido a su potencial zoonótico por la posibilidad de transmisión directa del perro al hombre y que ambos se encuentran bajo similares factores de riesgo.

La mayor frecuencia de reacción de los sueros durante la prueba fue a *L. icterohaemorrhagiae* y *L. canicola* (Fig. 1), las cuales tienen como hospedero reservorio los

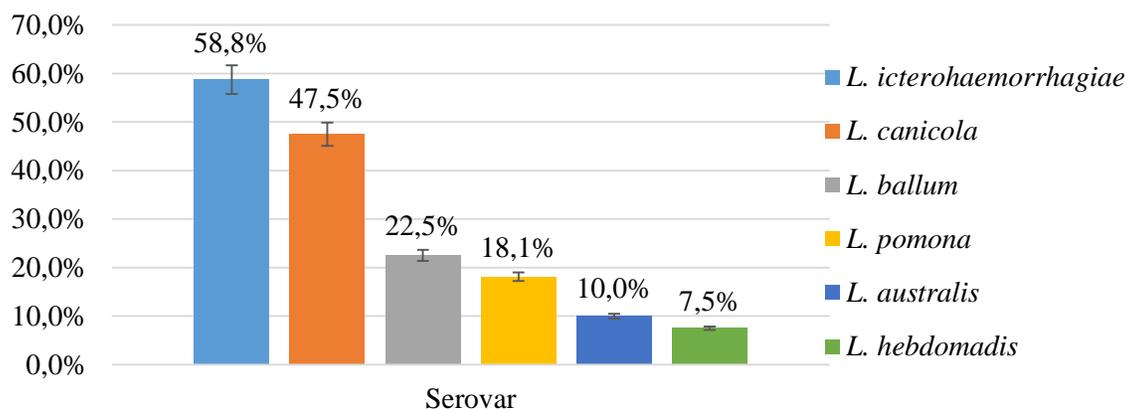


FIGURA 1. Frecuencia de serorreactividad a los serovares de *Leptospira* spp. estudiados./Seroreactivity frequency to the *Leptospira* spp. serovars studied.

roedores y los perros, respectivamente, y son capaces de inducir la producción de hemolisinas y de ocasionar cuadros clínicos severos (24,25,26), tanto en caninos como en personas.

Los estudios realizados en Mayabeque, Cuba, también reportan la *L. icterohaemorrhagiae* como el serovar de mayor frecuencia de presentación (17). De igual forma, en diferentes regiones tropicales de Sudamérica y países de África, se describe *L. icterohaemorrhagiae* como el serovar de mayor circulación en caninos, seguido de *L. canicola* (21,24,27,28).

Como se evidencia, las características del municipio Boyeros, con una alta densidad de perros/km² ^A y las condiciones ideales para la proliferación de roedores que contaminan con su orina las áreas a que tienen acceso los canes, hace que se eleve la prevalencia de estos dos serovares.

Aun cuando los restantes serovares estudiados muestran valores inferiores de prevalencia, resulta de gran importancia el hecho que existe una gran variedad de ellos circulando en el área de muestreo; sin embargo, en la mayoría de las vacunas que existe en el mercado (Canigen[®], Novivac[®]) solo se incluyen *L. icterohaemorrhagiae* y *L. canicola* (29,30), por lo que aún los animales vacunados están expuestos a la infección por otros

serovares ante los cuales no están protegidos, si conocemos que la inmunidad cruzada es escasa y que la protección es serovar dependiente (31,32).

Al discriminar la serorreactividad se comprobó que la mitad de los animales resultaron positivos para más de uno de los serovares estudiados (Tabla 2); por tanto, en un lugar específico pueden encontrarse varios de ellos a la vez. Las coaglutinaciones más frecuentes resultaron ser: *L. canicola* – *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* – *L. ballum* y *L. canicola* – *L. pomona*. Esto indica que, aunque puede existir un mínimo de reacciones cruzadas por la presencia de antígenos de membrana comunes entre los diferentes serovares y serogrupos (21,31), la presencia de títulos altos (33,34) en la mayoría de los sueros indica la coexistencia de dos o más serovares.

Los títulos de anticuerpos contra los seis serovares de *L. interrogans* estudiados, expresados en diluciones, se muestran en la Tabla 3, donde se observa que la mayoría de los animales presentó valores altos (1/400) (34). Esto resulta preocupante si conocemos que la duración de la inmunidad contra *Leptospira* spp es relativamente corta (8,23,35), por lo que la presencia de altos títulos de anticuerpos específicos puede relacionarse con una exposición continua o reciente al agente, capaz de inducir una respuesta inmune con la

TABLA 2. Frecuencia de coaglutinaciones del total de animales estudiados/ *Coagglutination frequency of the total number of the animals studied.*

Animales seropositivos	n	%
2 serovares	31	19,38
3 serovares	27	16,88
4 serovares	14	8,75
5 serovares	5	3,13
6 serovares	3	1,88
Total	80	50

TABLA 3. Títulos de anticuerpos contra los serovares de *Leptospira* spp. estudiados./*Antibody titers against the Leptospira spp serovars studied.*

Serovar	Positivos	Negativos	Diluciones		
			1/100	1/200	1/400
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	94	66	10	34	50
<i>L. canicola</i>	76	84	3	31	42
<i>L. ballum</i>	36	124	3	15	18
<i>L. australis</i>	16	144	2	6	8
<i>L. pomona</i>	29	131	0	14	15
<i>L. hebdomadis</i>	12	148	1	5	6

consecuente elevación de los títulos (36).

CONCLUSIONES

Exsiste una alta seroprevalencia de anticuerpos contra diferentes serovares de *Leptospira interrogans* en caninos del municipio Boyeros. Los serovares de mayor frecuencia de presentación fueron *L. icterohaemorrhagiae* y *L. canicola*.

REFERENCIAS

- Garcia L, Jorge S, Mesquita J P, Sinnott F, Kömmling F. Diagnosis of canine leptospirosis using an Immunomagnetic Separation- PCR Method. Brazilian Journal of Microbiology. 2012;8:602-605.
- Renaud C, Andrews S, Djelouadi Z, Lecheval S, Corrao-Revol N. Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava, grippotyphosa, mozdok. The Veterinary Journal. 2013;196:126-127.
- Mayer-scholl A, Luge E, Draeger A, Nockler K, Kohn B. Distribution of leptospira serogroups in dogs from Berlin, Germany. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2013;13:1-3.
- Martínez A, Días E, Argote E, Peñate O. Bacteriología Veterinaria. Cuba: Consejo Científico Veterinario Cuba. 2011. ISBN 978-959-7190-13-4.
- Sykes J, Hartmann K, Lunn K, Moore G, Stoddard R, Goldstein R. ACVIM Small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. J Vet Intern Med. 2010;211;1-13.
- Sandow K, Ramírez W. Leptospirosis. Redvet. 2005;VI (6):18-19.
- Yusti D, Arboleda M, Agudelo PA. Factores de riesgos sociales y ambientales relacionados con casos de leptospirosis de manejo ambulatorio. Biomédica. 2013;33:117.

8. Fernández R, Arrebola A, Batista N, Jirón W, Valdés B, Suárez Y, Infante J. Leptospirosis, una revisión actualizada. *Revista Veterinaria Argentina*. 2012;29:291.
9. Malajov Y, Panin A, Sovoliova G. Leptospirosis de los animales. La Habana: Ciencias Médicas. 2007.
10. Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera P, Pereira MM. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: Reported outbreaks and literature review (2002-2014). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014;11:1-20
11. OIE. Leptospirosis. In: Manual Terrestre de la OIE [Internet]. 7th ed. OIE; 2014 [cited 2017 Mar 1]. p. 1404. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.12_Leptospirosis.pdf.
12. García R, Reyes A, Basilio D, Ramírez M, Rivas B. Leptospirosis; un problema de salud pública. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 2013;60(1):57-70.
13. Bello S, Rodríguez M, Paredes A, Mendivelso F, Walteros D, Rodríguez F, Realpe ME. Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011. *Biomédica*. 2003;33(1):4.
14. ONEI (Oficina Nacional de Estadística e Información). Anuario Estadístico de Cuba 2015 [Internet]. La Habana, Cuba: ONEI; 2016 [cited 2017 May 29]. Available from: <http://www.onei.cu/aec2015.htm>.
15. Pfeiffer DU. Epidemiología Veterinaria: Una introducción. División Epidemiológica. Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias. Real Universidad de Londres. 2002;22.
16. Hernández R, Fernández C, Baptista M. *Metodología de la investigación*. 5ta ed. México: McGraw-Hill. 2010. ISBN 978-607-15-0291
17. García RL, Feraud D, Lugo S, Machado H, Abeledo MA. Comparación entre un ELISA indirecto y la técnica de aglutinación microscópica para la detección de anticuerpos antileptospirales en caninos. *Rev Salud Anim*. 2014;36(2):119-121.
18. Lazo L, Santana I, Castro A, Madruga M, Cepero O, Lazo L. La vigilancia epidemiológica como herramienta de prevención y diagnóstico precoz de enfermedades zoonóticas. *RedVet*. 2010;11(3):1-7.
19. Tuemmers C, Lüders C, Rojas C, Serri M, Espinoza R, Castillo C. Prevalencia de leptospirosis en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco. *Rev Chilena Infectol*. 2013;30(3):254-255.
20. Arrieta G, Calderón A, Rodríguez V, Álvarez J, Mattar S. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* (*sensu lato*) en caninos semidomésticos en Sincelejo, Sucre, Colombia. *Revista de Veterinaria y Zootecnia*. 2016;10(1):89-103,
21. Rodríguez AL, Ferro BE, Varona MXV, Santafé M. Evidencia de exposición a *Leptospira* en perros callejeros de Cali. *Biomédica*. 2004;24: 292-295.
22. Romero M, Sánchez J. Seroprevalencia de la leptospirosis canina de tres municipios del departamento del Tolima, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*. 2009;14(2): 4-6.
23. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011;73:408-419.
24. Hennebelle JH, Sykes JE, Foley JF. Risk Factors Associated with leptospirosis in dogs from northern California 2001-2010. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2014;14:1-7.
25. Barthelemy A, Magnin M, Pouzot-nevoret C, Bonnet-Garin JM, Hugonnard M, Thollot G. Hemorrhagic, Hemostatic, and Thromboelastometric disorders in 35 dogs with a clinical diagnosis of leptospirosis: A

- Prospective Study. J Vet Intern Med. 2016;(14626):1-13.
26. Koizumi N, Mizutani M, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S, Funatsumaru S, Ohnishi M. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. Journal of Medical Microbiology. 2013;62:632-633.
 27. Gualtieri CA, Carlín C, Peralta L, Peirone C, Gattarello V, Marc L, François S. Evaluación clínica, bioquímica y hematológica de caninos seropositivos a distintos serovares de *Leptospira interrogans*. InVet. 2012;14(2):131-139.
 28. Roqueploa, C, Mariéa J, Fontaine GA, Kodjoc A, Davousta B. Serological survey of canine leptospirosis in three countries of tropical Africa: Sudan, Gabon and Ivory Coast. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2014;987:1-5.
 29. Quintana D. Virbac Shaping the future of animal health Inmunología neonatal [en línea]. Colombia; 18 noviembre 2015 [Consulta: 17 abril 2017]. Disponible en: <https://www.virbac.co/Inmunologia-Neonatal-cachorros>
 30. Valencia CS, Ortega C, Saldivia C, Martínez JLA. Estudio seroepidemiológico en un criadero canino para evaluar la respuesta en anticuerpos frente a *Leptospira* spp. Revista Sapuvet de Salud Pública. 2010;(1):49-64.
 31. Levett P, Haake D. *Leptospira* species (leptospirosis). En: Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7 ed. Orlando Florida: Saunders Elsevier; 2009.
 32. Henricus L, Klaasen E, Adler B. Recent advances in canine leptospirosis: focus on vaccine development. Veterinary Medicine: Research and Reports. 2015;6: 245- 260.
 33. Luna A, Molesb C, Gavaldón R, Navad V, Salazar G. La leptospirosis canina y su problemática en México. Rev Salud Anim. 2008;30(1):5-8.
 34. Herrera B, Dilave RDM. *Leptospirosis*, interpretación de resultados serológicos en animales. 2012. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicas/enfermedades_reproduccion/55-interpretacion_leptospira.pdf.
 35. Tanase O, Gheorghita I, Pavli C, Perianu T. Researches on vicinal immune responses in canine leptospirosis. Cercetări Agronomice în Moldova. 2011;34 (4):148.
 36. Ellis WA. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? Veterinary Record. 2010;10:11-36.