



## ARTÍCULO ORIGINAL

### Ensayo comparativo entre Ag inactivado macroaglutinante y Ags vivos microaglutinantes en el diagnóstico de leptospirosis

### Comparative test between Ag inactivated macro-agglutination and in vivo Ags agglutination in the diagnosis of leptospirosis

Hildefonso Cabezas Alfonso<sup>1</sup>, Yunio Fernández Barroso<sup>2</sup>, Loidel Cabezas Maya<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doctor en Medicina Veterinaria. Doctor en Ciencias en Microbiología e Inmunología. Experto en Leptospirosis de la OPS. Asesor en Investigaciones Biomédicas. Profesor Consultante y Titular. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba: [loidel@princesa.pri.sld.cu](mailto:loidel@princesa.pri.sld.cu)

<sup>2</sup> Licenciado en Tecnología de la Salud. Perfil Microbiología. Laboratorio Provincial de Microbiología. Director Técnico del Laboratorio Provincial. Pinar del Río Cuba: [fernandez1986@princesa.pri.sld.cu](mailto:fernandez1986@princesa.pri.sld.cu)

<sup>3</sup> Médico. Residente de Segundo Año de Medicina General Integral. Policlínico Universitario Augusto Turcios Lima, Pinar del Río. Cuba: [cabezas@ucm.pri.sld.cu](mailto:cabezas@ucm.pri.sld.cu)

Recibido: 20 de diciembre de 2016  
Aprobado: 23 de febrero de 2017

### RESUMEN

**Introducción:** existen diversos métodos para el diagnóstico serológico de leptospirosis pero es necesario investigar más, para conseguir uno eficiente, rápido y económico que satisfaga el diagnóstico.

**Objetivo:** evaluar Ag polivalente para diagnóstico macroscópico de leptospirosis frente a la microaglutinación.

**Método:** se elaboró un Ag leptospiral polivalente y el diluyente para sueros de problemas en el Centro de Leptospirosis de la Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río, sometiendo a ensayo con sueros de pacientes llegados al Laboratorio Provincial de Microbiología. Se compararon entre macro y microaglutinación 430 sueros, 260 de pacientes sospechosos y positivos de leptospirosis, 120 de 10 consultorios de familia, 20 positivos de brucelosis, 15 positivos a sífilis y 15 sueros hiperinmunes. Los sueros fueron diluidos 1:80, para macroaglutinación con su diluyente y para microaglutinación 1:100 con solución fisiológica

**Resultados:** los resultados se procesaron mediante comparación de proporciones con intervalo de confianza del 95%, estimando la sensibilidad y especificidad. De los sueros sospechosos, resultaron positivos a microaglutinación el 2,63% y un 3,21% a macroaglutinación), no hubo diferencia no significativa. Los positivos a brucella y sífilis fueron negativos a leptospira y los hiperinmunes positivos, en general especificidad y sensibilidad del Ag leptospiral

polivalente fue 99,73 y 99,95% respecto al 100% de la microaglutinación.

**Conclusiones:** no hubo diferencia significativa entre microaglutinación y macroaglutinación ( $P \geq 0,05$ ). Fue excelente tanto la especificidad como la sensibilidad del AgLP. Los ensayos hay que extenderlos a distintos grupos poblacionales. El método resulta muy valioso.

**DeCS:** LEPTOSPIROSIS, ANTIGENO, DIAGNOSTICO

---

## ABSTRACT

**Introduction:** there are several methods for the serological diagnosis of leptospirosis but more research is needed to achieve an efficient, rapid and economical way that satisfies the diagnosis.

**Objective:** to evaluate polyvalent Ag for macroscopic diagnosis of leptospirosis versus micro-agglutination.

**Method:** a polyvalent *Leptospira* Ag and the dilution for sera were prepared at Leptospirosis Center of Pinar del Rio in the University of Medical Sciences, and tested with sera from patients arriving at the Provincial Laboratory of Microbiology; 430 sera, 260 of suspect and leptospirosis positive patients, 120 out of 10 family practices, 20 positive for brucellosis, 15 positive for syphilis and 15 hyper-immune sera were compared between macro and micro-agglutination sera. The sera were diluted 1:80, for macro-agglutination with their dilution and for 1:100 micro-agglutination with saline solution.

**Results:** the results were processed by comparison of proportions with 95% of confidence interval, estimating sensitivity and specificity. Of the suspected sera, they were positive to micro-agglutination (2.63% and 3.21% to macro-agglutination), there was no non-significant difference. Positive to *Brucella* and syphilis were negative to *Leptospira* and the positive hyper-immune, in general specificity and sensitivity of polyvalent *Leptospira* Ag was 99.73 and 99.95% with respect to 100% of micro-agglutination.

**Conclusions:** there was no significant difference between micro-agglutination and

macro-agglutination ( $P \geq 0.05$ ). Both the specificity and sensitivity of AgLP were excellent. The trials must be extended to different population groups. The method is very valuable.

**DeCS:** LEPTOSPIROSIS, ANTIGEN, DIAGNOSIS

---

## INTRODUCCIÓN

Las leptospirosis se observaron por primera vez en 1907, en tejido de riñón de un paciente descrito inicialmente como una víctima fatal de fiebre amarilla. *Leptospira* está constituido por espiroquetas flexibles y helicoidales de 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 6-20  $\mu\text{m}$  de longitud, con extremidades encurvadas en forma de gancho. Característicamente, presentan tinción de Gram débil ya que tienen la típica estructura de pared de Gram negativas. Para su visualización se usan técnicas de impregnación argéntica.<sup>1-3</sup>

Estructuralmente las leptospirosis tienen un protoplasma helicoidal cilíndrico constituido por material nuclear, y la membrana citoplasmática con peptidoglicanos en su pared celular. Los mayores componentes antigénicos de leptospirosis patógenas son los lipopolisacáridos (LPS). Además hay dos flagelos axiales, o filamentos axiales, los cuales se adhieren a los extremos opuestos como si fueran discos.<sup>4-6</sup>

Según la clasificación serológica, el género *Leptospira* incluye leptospirosis saprófitas (*Leptospira biflexa sensu lato*) y patógenas (*Leptospira interrogans sensu lato*) Existen más de 260 serovares de *L. interrogans*, los serovares que están antigénicamente relacionados son agrupados en serogrupos. Aunque actualmente para los estudios o pesquises epidemiológicos la clasificación ha sido cambiada empleándose una clasificación genética que distingue 19 genomaspecies.<sup>7-8</sup>

La leptospirosis es una enfermedad de importancia mundial. Animales domésticos y silvestres pueden portar las leptospirosis y contribuir a la diseminación del

microorganismo en la naturaleza. Puede afectar a las personas al ponerse en contacto con los microorganismos de manera directa o indirecta, por esta razón deben tomarse medidas preventivas para hacer decrecer la infección en los expuestos en riesgo.<sup>9-10</sup>

Las condiciones subtropicales de Cuba favorecen mucho la existencia de fuentes permanentes de infección para estos microorganismos, por cuanto Cuba posee condiciones muy semejantes a las de otros países de América y el Caribe.<sup>11-12</sup>

En Cuba esta enfermedad constituye un problema de salud y cada vez cobra mayor importancia, esto ha sido demostrado por muchos trabajos publicados en el país, de autores que han investigado desde el oriente hasta el occidente, haciendo estudios serológicos, bacteriológicos, clínicos y epidemiológicos y que son referidos por estos autores que se mencionan aquí.<sup>13-14</sup>

La leptospirosis se puede diagnosticar por cultivo, detección de antígenos, ácidos nucleicos, o serología. Los valores de la química del suero y los análisis del líquido cefalorraquídeo pueden respaldar el diagnóstico. En los humanos, la leptospira puede aislarse de la sangre. También los fluidos cefalorraquídeos o la orina.

El cultivo puede ser difícil y quizás requiera de 13 a 26 semanas. La identificación con las especies, el serogrupo y la serovariedad se realiza en laboratorios de referencia, usando técnicas genéticas e inmunológicas. Las *Leptospiras* spp. Se pueden identificar en muestras clínicas por inmunofluorescencia y tinción inmunohistoquímica, así como a través de pruebas de ADN y técnicas de reacción de la cadena de polimerasa (PCR). Se puede utilizar un microscopio de campo oscuro, pero no es específico.<sup>1-5, 15</sup>

La mayoría de los casos humanos de leptospirosis se diagnostican por serología, las pruebas de serología más comúnmente utilizadas son la prueba de aglutinación microscópica, anteriormente conocida como prueba de aglutinación-lisis.<sup>1</sup>

El test de microaglutinación (MAT) es específico para serogrupo pero no para serovariedad y puede complicarse por

reacciones cruzadas. Las pruebas usadas con menos frecuencia incluyen fijación del complemento, radioinmunoensayo, inmunofluorescencia, contrainmunolectroforesis e inmunoensayo de capas finas. La prueba de aglutinación en portaobjetos macroscópica puede utilizarse para diagnóstico presuntivo, pero no es específica. Un título alto con síntomas sistémicos sugiere un caso agudo, pero se necesita un título en aumento para un diagnóstico definitivo. Existen pocos ensayos específicos para serovariedad en medicina humana.<sup>15</sup>

Estos estudios, como lo indica la literatura internacional<sup>1-2,15</sup>, tienen el objetivo principal de definir qué nivel de predicción se puede tener para la utilización de un método de diagnóstico. Estos sueros fueron seleccionados para poder discriminar cualquier reacción cruzada con otras enfermedades, que de hecho poseen una similitud clínica muy grande. No hay que desconocer que dichas enfermedades pueden estar presentes simultáneamente en un paciente en un momento determinado.

Existen muchas técnicas y métodos de diagnóstico de la leptospirosis, algunos de los cuales son mencionados en el estado del arte en este trabajo, pero a pesar de los años y sus dificultades, sigue siendo el MAT<sup>1-5</sup> el test de referencia frente al que se miden todos los demás.

Por lo antes expuesto se plantean limitaciones significativas para el diagnóstico precoz utilizando cualquier prueba serológica, el ensayo de una segunda muestra debe considerarse obligatoria. Moreover, confirmation of rapid diagnostic test results by a reference test has been recommended (Goris et al. 2013b). Por otra parte, se ha recomendado la confirmación de los resultados de las pruebas de diagnóstico rápido por una prueba de referencia.<sup>13-15</sup>

La evaluación de las pruebas serológicas para la leptospirosis ha sido problemática porque hay pocos laboratorios equipados para realizar la prueba serológica definitiva (MAT), y hay menos laboratorios con capacidad para aislar e identificar leptospiras de pacientes.

A large body of the literature consists of reports on studies that have been ill-designed and which use less than perfect case definitions, leading to misleading estimates of sensitivity and specificity. Un gran cuerpo de la literatura consiste en informes sobre estudios que han sido mal diseñados y que usan menos de las definiciones de caso perfecto, dando lugar a estimaciones engañosas de sensibilidad y especificidad. Ideally, new serological assays should be evaluated in clinical trials of consecutive patients investigated using a case definition which includes both MAT and culture results, and which are conducted in multiple regions, where different leptospiral serovars are prevalent and where the differential diagnoses may vary widely ( Smits et al. 2000a, b). Idealmente, los nuevos ensayos serológicos deben ser evaluados en ensayos clínicos de pacientes consecutivos investigados, utilizando una definición de caso que incluya tanto MAT y resultados de cultivo y que se lleven a cabo en múltiples regiones, donde prevalecen diferentes serovares leptospíricos y donde los diagnósticos diferenciales pueden variar ampliamente.

Assays may perform differently in different populations (Desakorn et al. 2012; Levett and Branch 2002). Los ensayos pueden comportarse de forma diferente en diferentes poblaciones. Alternatively, well-designed studies conducted in individual centers may be compared, providing the limitations of this approach are recognized (Levett 2001). Alternativamente, estudios bien diseñados son reconocidos, realizados en centros individuales, pueden ser comparados, proporcionando las limitaciones de este enfoque. Evaluations performed using collections of sera in reference laboratories may be useful for determining sensitivity of assays, but specificity is dependent upon the selection of noncase sera representative both of other diseases and the normal population. Las evaluaciones realizadas utilizando colecciones de sueros en laboratorios de referencia pueden ser útiles para determinar la sensibilidad de los ensayos, pero la especificidad depende de la selección de sueros no caseros representativos de otras enfermedades y de la población normal. Parallel studies in clinical and reference settings may yield quite different results (Bajani et al. 2003; Hull-Jackson et al. 2006). Estudios paralelos en el

ámbito clínico y de referencia pueden dar resultados muy diferentes.<sup>1</sup>

Particularmente, en la provincia Pinar del Río esta zoonosis se ha venido estudiando profundamente en los últimos años y se avanza en el esclarecimiento de la estructura etiológica de la misma, a partir de las investigaciones bacteriológicas y en el diagnóstico serológico utilizando tanto la MAT como el nuevo AgLP al que se hace referencia en el trabajo.

Son estas razones las que han promovido el estudio con el objetivo de evaluar este Ag como predictor para diagnóstico macroscópico de leptospirosis frente a la técnica de microaglutinación.

---

## MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio longitudinal prospectivo durante el 2016, mediante una evaluación comparativa cuantitativa y cualitativa de un Ag leptospiral polivalente para diagnóstico macroscópico para la Atención Primaria de Salud, obtenido en el Centro de Leptospirosis de la Facultad de Ciencias Médicas Dr. Ernesto Che Guevara de la Serna, conjuntamente con el Laboratorio Provincial de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología ambos de Pinar del Río.

La comparación se hizo frente al test de microaglutinación, este es el test de referencia de la OMS. Se procesaron en total 430 muestras, de ellas el 60,4% de pacientes sospechosos y positivos de leptospirosis cuyos sueros fueron registrados en el Centro Provincial de Microbiología, procedentes de diversos municipios, el 10% de sueros escogidos de manera aleatoria de un universo de mil 200 personas entre 20 y 40 años de edad pertenecientes a 10 consultorios del médico de la familia del Consejo Popular La Conchita, 20 positivos a brucella, 15 sueros positivos a treponema seleccionados en el CPHEM y 15 sueros positivos a leptospira hiperinmunes preparados en el Centro de Leptospirosis de la propia Facultad de Ciencias Médicas.

Los sueros para estas dos técnicas fueron diluidos 1:80, para el AgLP con su diluyente específico especial preparado a tal efecto y para el MAT 1:100 con solución fisiológica como diluyente. Las muestras fueron recepcionadas en el Laboratorio Provincial de Microbiología. Las 10 muestras eran sueros positivos hiperinmunes (títulos de 1:3200 con el MAT) de conejos inoculados con leptospiras vivas. Los sueros se consideraron positivos a partir de un 50 % de leptospiras aglutinadas o más por el test MAT. Se estimaron hiperinmunes por el alto título alcanzado.

La comparación se hizo mediante un test de proporciones, además se estimó la sensibilidad y especificidad del método macroscópico, con índice de confiabilidad del 95%.

El diagnóstico macroscópico se realiza en un portaobjeto donde se coloca determinada cantidad de los reactivos usados para esta técnica. El suero se debe unir al diluyente lo más uniformemente posible mediante movimientos rotatorios manuales con un aplicador, luego de ello se deposita el AgLP coloreado con un indicador, moviéndolo de igual manera para unirlo uniformemente al complejo suero y diluyente y se espera unos segundos para el cambio de color de la reacción, si el color adquiere una tonalidad entre violeta y totalmente azul el suero resulta positivo y si se torna entre rojo y rosado se declara negativo, con posibilidades a repetirse la prueba luego de cinco a siete días.

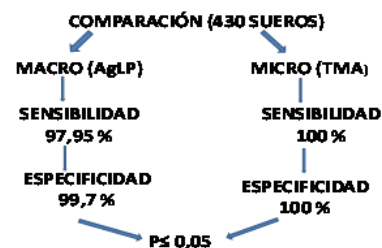
## RESULTADOS

El AgLP logrado no mostró diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ) con respecto a la MAT en todos los casos, es decir, respecto a los sueros trabajados por ambas técnicas (tabla 1), tanto negativos como positivos, a pesar de que la MAT arrojó 11,16% positivos mientras la macro arrojó 11,39%.

**Tabla 1.** Macro y microaglutinación versus diagnóstico de los sueros estudiados. Centro de Leptospirosis. Facultad de Ciencias Médicas. Pinar del Río, 2016.

PROCEDENCIA	MICROAGLUTINACIÓN					MACROAGLUTINACIÓN				
	N	p	%	n	%	N	p	%	n	%
CM	120	10	8,3	110	91,7	120	9	7,5	111	92,5
Lab. Prov. Mic.	260	23	8,84	237	91,16	260	25	9,62	235	90,38
Brucella LPM	20	0	0	20	100	20	0	0	20	100
Sífilis LPM	15	0	0	15	100	15	0	0	15	100
S Hiperinmunes	15	15	100	0	0	15	15	100	0	0
Totales	430	48	11,16	382	88,84	430	49	11,39	381	88,61

CM- Consultorio médico Lab. Prov. Mic. --Laboratorio Provincial de Microbiología; N- muestras de sueros; p- positivo; n-negativo



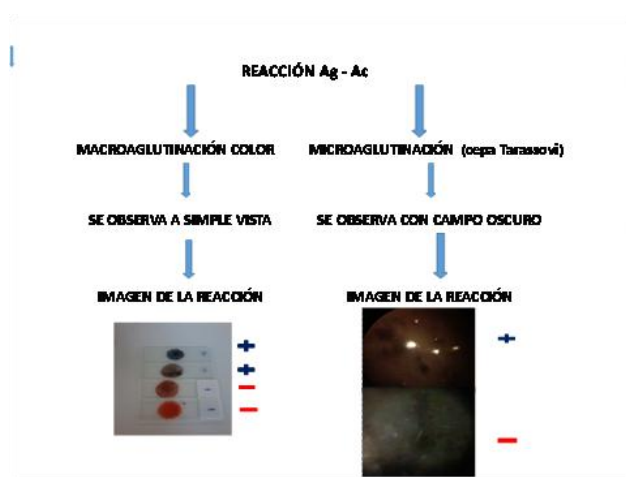
**Figura 1.** Comparación entre ambos métodos respecto a sensibilidad y especificidad.

De los sueros procedentes de los consultorios resultaron positivos a MAT el 2,63% y a la macroscopía un 3,21% con el AgLP ensayado, diferencia no significativa ( $P \leq 0,05$ ).

Respecto a los sueros humanos positivos a brucella todos fueron negativos así como los positivos a sífilis y los 15 sueros hiperinmunes fueron positivos con ambas técnicas, en general la sensibilidad y la especificidad del AgLP fue del 97,95 y 99,73% respectivamente frente al MAT, que como técnica de referencia ambas variables se ponderaron en un 100 %.



**Figura 2.** Características diferenciales de los dos métodos c



**Figura 3.** Imágenes en láminas portaobjetos (macroaglutinación AgLP) de casos positivos y negativos comprobados por microaglutinación (400 X). Realizadas e impresas en el Centro de Leptospirosis de la Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cortesía de los autores.

## DISCUSIÓN

Existen muchas técnicas y métodos de diagnóstico de la leptospirosis<sup>15</sup>, algunos de los cuales son mencionados en la introducción y a pesar de los años y sus dificultades sigue siendo la MAT<sup>1-5</sup> la técnica de referencia frente a la que se miden todos los demás.

No obstante, ser la macroaglutinación una técnica de las menos referidas por sus resultados y que muchas veces se emplea para tamizajes<sup>17</sup>, los investigadores del Centro de Leptospirosis de la Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río, han logrado introducir algunas modificaciones que facilitan su uso a partir de la obtención y elaboración de un AgLP, que ha de servir a nivel de la Atención Primaria de Salud, como una orientación bien definida para los médicos que desde el consultorio y el policlínico enfrentan los casos de esta sistemática y endémica enfermedad, teniendo que tomar decisiones rápidas para salvar vidas y para permitir una mejor calidad de atención al paciente

Los autores consideran, tomando en cuenta estos resultados y de los mencionados en algunos trabajos sobre el tema, resultados que difieren bastante que el Ag logrado posee características esenciales, en las que se incluyen primordialmente la sensibilidad y especificidad confrontadas con el MAT, que la aplicación del Ag ensayado es relevante, a pesar de no denunciar el serogrupo, pero un sí o un no combinados con otros métodos (clínico, epidemiológico) orientan bastante en determinadas circunstancias.

## CONCLUSIONES

Se logró un Ag leptospiral que permite simplificar el procedimiento de ejecución, factible a realizar por la enfermera en el consultorio o en el domicilio del paciente, sin necesidad de trasladarlo a otro lugar, minimiza el uso de recursos y mejora la sensibilidad y especificidad diagnóstica, abreviando el tiempo de su resultado, y que sean confiables, lo que contribuye a la instauración rápida y oportuna del tratamiento.

Simplemente, con un cambio de coloración del suero del paciente sobre un portaobjeto, se puede obtener un resultado con una

apreciable certidumbre de al menos un 95%, lo que equivale a una alta confiabilidad.

---

## AGRADECIMIENTOS

Alejandro Mederos Blanco: Técnico especialista del Centro de Leptospirosis, por su motivación y participación en el proyecto de investigación que tributó a esta publicación.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. David A. Haake. HaakeD A, and Paul N. LevettLevettPN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol.*[Internet]2015;2015 [Citado 7 de febrero de 2017];387: 65–97.387: [Aprox. 32p.].doi: 10.1007/978-3-662-45059-8\_5Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388133>
2. Coutinho Mariana L , MatsunagaJ , -Chieh Wang L , de la Peña Monctezuma A , Lewis M S , Babbitt T J, et al. Kinetics of *Leptospira interrogans* Infection in Hamsters after Intradermal and Subcutaneous Challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* [Internet]2015;2014 [Citado 7 de febrero de 2017];8(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411782>
3. Fouts DE , Matthias MA , Adhikarla H , Adler B , Amorim-Santos L, et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira* *PLoS Negl Trop Dis* [Internet] 2015;2016 Feb[Citado 7 de febrero de 2017];10(2). Disponible en: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004403>
4. Wunder EA, Figueira CP , Santos GR, Lourdault K , Matthias MA, et al. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. *Infect Immun.* [Internet] 2015;2016 Jul[Citado 7 de febrero de 2017]; 84(7): [Aprox. 10p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141082>
5. Narayanavari SA, Lourdault K , Sritharan M , Haake DA , Matsunaga J, Narayanavari SA. Role of sph2 Gene Regulation in Hemolytic and Sphingomyelinase Activities Produced by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis.* [Internet] 2015;2015 Ago [Citado 7 de febrero de 2017];9(8): [Aprox. 6p.]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003952>
6. Mohammadi E, Sakhaee E. Association between serum copper concentration and the risk of bovine leptospirosis. *Comp Clin Pathol.* [Internet] 2015[Citado 7 de febrero de 2017]; 24(6): [Aprox. 3p.]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00580-015-2069-0>
7. Martins G, Lilenbaum W. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the sero epidemiology of the infection in tropical regions. *Veterinary Research.* [Internet] 2013[Citado 7 de febrero de 2017]; 9: [Aprox. 1p]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24289165>
8. Hamond C, Pinna A, Martins G, Lilenbaum W. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. *Trop Anim Health Prod.*[Internet] 2014[Citado 7 de febrero de 2017];46(1): [Aprox. 10p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990441>
9. Andre-Fontaine G, Aviat F. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr Microbiol.* [Internet] 2015 [Citado 7 de febrero de 2017];71(1): [Aprox. 6p.]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00284-015-0836-4>
10. Taugamoia A, NiutouaI, Labrousse D, Gular R, Bogdanowicz W, Jundan H, Ciryli G. Leptospirosis risk increases with changes in species composition of rat populations.

Naturwissenschaften. [Internet] 2013 [Citado 7 de febrero de 2017];100(4): [Aprox. 3p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617346/>

11. Pulido-Villamarín A, Carreño-Beltrán G, Mercado-Reyes M, Ramírez-Bulla P. Situación epidemiológica de la leptospirosis humana en Centroamérica, Suramérica y el Caribe. Univ Sci. [Internet] 2014 [Citado 7 de febrero de 2017];19(3): [Aprox. 17p.]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0122-74832014000300007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-74832014000300007&lng=es&nrm=iso)

12. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Méd Mal infect. [Internet] 2013 [Citado 7 de febrero de 2017];43(1): [Aprox. 8p.]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X12003198>

13. Khan MA, Islam S, Khan SA, Khan I, Shafie S, Gul T. Prevention of Leptospirosis infected vector and human population by multiple control variables. Int J Appl. [Internet] 2014 [Citado 7 de febrero de 2017]; (2014): [Aprox. 9p.]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/aaa/2014/619035/>

14. Martins G, Lilenbaum W. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions.

Tropical Animal Health and Production. [Internet] 2014 [Citado 7 de febrero de 2017];46(1): [Aprox. 6p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24085419>

15. Cortizo P, Loureiro AP, Martins G, do Rodrigues Patrícia R, Pego Faria B, Lilenbaum W, et al. Risk factors to incidental leptospirosis and its role on the reproduction of ewes and goats of Espírito Santo state, Brazil. Trop Anim Health Prod. [Internet] 2015 [Citado 7 de febrero de 2017];47(1): [Aprox. 4p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25274622>



**Hildefonso Cabezas Alfonso:** Doctor en Medicina Veterinaria. Doctor en Ciencias en Microbiología e Inmunología. Experto en Leptospirosis de la OPS. Asesor en Investigaciones Biomédicas. Profesor Consultante y Titular. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. ***Si usted desea contactar con el autor de la investigación hágalo [aquí](#)***