

ARTÍCULO ORIGINAL

Comparación entre un ELISA indirecto y la técnica de aglutinación microscópica para la detección de anticuerpos antileptospirales en caninos

Radamés L. García^I, Dania Feraud^I, Sonia Lugo^{II}, Héctor Machado^{III}, María A. Abeledo^{IV}

^IFacultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: rada@unah.edu.cu; ^{II}Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, Bejucal, Mayabeque, Cuba; ^{III}Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba;

^{IV}Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Autopista Nacional y Carretera de Jamaica. Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Con el objetivo de comparar un ELISA indirecto elaborado a partir de *Leptospira biflexa* serogrupo *Semaranga* serovar Patoc, con la técnica de aglutinación microscópica (de su sigla en inglés MAT) en el diagnóstico serológico de la leptospirosis canina, se utilizaron 77 muestras de suero sanguíneo de caninos con sospecha de leptospirosis (Grupo 1) y 84 muestras de animales aparentemente sanos (Grupo 2), los cuales fueron investigados simultáneamente por el ensayo inmunoenzimático y por la técnica de aglutinación microscópica (MAT). Los valores de prevalencia obtenidos por el MAT y el ELISA, así como entre ambos grupos no mostraron diferencias significativas, lo que indica la coincidencia entre ambos métodos y la existencia de una amplia circulación de cepas de leptospiras en animales clínicamente sanos. Los serovares más frecuentes fueron *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* en el Grupo 1 y *Canicola* y *Ballum* en el Grupo 2. La técnica de ELISA indirecto en ambos grupos mostró una coincidencia con el MAT de 92.2% y 91.6% respectivamente. El ELISA evaluado mostró una sensibilidad relativa de 92,8% y una especificidad relativa de 91,8%, en el Grupo 1 y de 90,3% y 92,4% en el Grupo 2. El Coeficiente Kappa fue similar en ambos grupos (0,8) confirmando la concordancia entre ambas técnicas. Por los resultados obtenidos se recomienda continuar el desarrollo de este ELISA con el fin de utilizarlo en el diagnóstico de la leptospirosis canina.

Palabras clave: leptospirosis canina, diagnóstico serológico, ELISA, MAT.

Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay and the microscopic agglutination test for the detection of leptospiral antibodies in dogs

ABSTRACT: In order to compare an indirect ELISA with the use of antigen derivated from *Leptospira biflexa Semaranga* serogroup, serovar Patoc and microscopic agglutination test (MAT) in the serological diagnosis of canine leptospirosis, 77 samples of blood serum from dogs with suspected leptospirosis (Group 1) and 84 samples from apparently healthy animals (Group 2) were used. They were simultaneously researched by the enzyme immunoassay technique and microscopic agglutination test (MAT). Prevalence values obtained by MAT and ELISA, and between the two groups, showed no significant differences indicating coincidence between the two methods and the existence of a widespread circulation of leptospire strains in clinically healthy animals. The most frequent serovars were *Canicola* and *Icterohaemorrhagiae* in Grupo 1 and *Canicola* and *Ballum* in Group 2. The indirect ELISA in both groups showed full coincidence with MAT, 92,2% and 91,6% respectively. The ELISA evaluated showed a relative sensitivity of 92,8% and a relative specificity of 91,8% in Group 1, and 90,3% and 92.4% in Group 2 respectively. Kappa coefficient was similar in both groups (0,8) confirming correlation between the two techniques. From the results obtained, it is recommended to continue this development with the use this ELISA in the diagnosis of canine leptospirosis.

Key words: canine leptospirosis, serological diagnosis, ELISA, MAT.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis que se encuentra en todos los continentes y afecta a casi todos los países con una gran incidencia en áreas tropicales y subtropicales, cuyo agente etiológico es *Leptospira interrogans sensu lato*. En zonas de clima templado es posible encontrarla en las estaciones de verano e inicio de otoño. En los últimos años la epidemiología de la leptospirosis ha sufrido cambios relacionados con las variaciones del ecosistema urbano, provocados por desastres naturales (1,2). Actualmente es considerada en varios países, una enfermedad reemergente (3).

Los estudios en Cuba sobre la aparición de brotes de la enfermedad están muy relacionados a su condición de país tropical y régimen de lluvia en determinada época del año, influenciada por factores de riesgo como la labor temporal o permanente en tareas agrícolas y la crianza y tenencia de animales domésticos en terrenos húmedos con alta infestación de roedores (4).

Soca *et al.* (5) señalan a la leptospirosis como la enfermedad de mayor impacto tanto en el sector poblacional como animal, identificando a los caninos asociados a estos sucesos como los principales animales transmisores de la enfermedad.

El perro actúa como un potencial diseminador de esta enfermedad ya que mantiene una estrecha relación con el hombre, y al mismo tiempo con otros animales tanto domésticos como salvajes (6). A pesar de su importancia, la leptospirosis canina frecuentemente es subdiagnosticada (7).

Debido a que las manifestaciones clínicas de la leptospirosis varían en tipo y gravedad, tanto en el hombre como en animales, es casi imposible la confirmación de la infección por la clínica solamente (8). Es por ello, que el diagnóstico de la leptospirosis se realiza mediante análisis serológicos y bacteriológicos, lo que ha permitido aislar y conocer los serovares que más circulan, hasta obtener cepas vacunales y sueros hiperinmunes. El aislamiento del organismo infectante es la mejor manera de establecer el diagnóstico definitivo, pero la obtención de cultivos positivos puede demorar más de 12 semanas y algunos serovares son extremadamente difíciles de aislar (9).

En Cuba, está normado el envío de muestras de sangre de animales con síntomas y signos de leptospirosis a la Red de Laboratorios y se emplea para el diagnóstico la técnica de aglutinación microscópica (MAT), la cual utiliza antígenos vivos (10) y es la prueba estándar recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (11). Esta técnica presenta varias desventajas: requiere de la utilización de varios serovares de

leptospiras en fase exponencial de crecimiento (cultivos de 4 a 14 días), lo que causa problemas en la estandarización y constituye un riesgo para el personal, además necesita de un operario altamente capacitado para la interpretación de los resultados.

La técnica ELISA puede emplearse como prueba tamiz para evaluar el estado inmunológico de una gran cantidad de sueros de animales, es más rápida y menos compleja en su ejecución y capaz de reafirmar la sospecha clínica y epidemiológica de la enfermedad (12). Se han realizado estudios para el diagnóstico serológico de la leptospirosis, mediante procedimientos inmunoenzimáticos como el ELISA en sus diversas variantes, que incluyen antígenos recombinantes y se han evaluado comparándolos con el MAT (13), con resultados variables en dependencia de la cepa utilizada o antígeno utilizado. Acha *et al.* (14) refieren el empleo por Faine en 1982 de antígeno de la cepa *Patoc* de una leptospira saprófita (*L. biflexa*) en la técnica de aglutinación en placa como prueba género-específica para el diagnóstico de la leptospirosis en animales de preferencia en el período agudo de la enfermedad.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar un ELISA con la utilización de un antígeno de *L. biflexa serogrupo Semarang*, serovar *Patoc* para detectar anticuerpos antileptospirales en sueros sanguíneos de caninos con sospecha de leptospirosis y caninos aparentemente sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 77 sueros de caninos con sospecha de leptospirosis por sus síntomas clínicos, procedentes de las Clínicas Veterinarias (Grupo 1) y enviados al Centro Nacional de Epizootiología, Diagnóstico e Investigación (CENEDI) y 84 muestras de animales aparentemente sanos procedentes de un asilo canino de la provincia Mayabeque que habían sido recogidos en la vía pública (Grupo 2).

Todas las muestras de sangre se colectaron de la vena radial. La sangre se dejó coagular y después se centrifugó para obtener el suero, que se conservó en congelación en viales identificados, hasta su procesamiento.

Procedimiento de las Técnicas

a) Microaglutinación (MAT).

Todas las determinaciones se realizaron en el CENEDI de acuerdo con la Norma Ramal Leptospirosis. (1994). Diagnóstico de Laboratorio. Rectificación. NRAG-673 (9). Se emplearon los serovares *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* y *Australis*.

b) ELISA (Indirecto).

El antígeno empleado para la identificación por ELISA de anticuerpos en los sueros se obtuvo a partir de *L. biflexa* serogrupo *Semaranga*, serovar *Patoc* obtenida, purificada y certificada en el Centro Nacional de Epizootiología, Diagnóstico e Investigaciones (CENEDI). Para obtener el antígeno, la cepa fue inactivada con formaldehído al 1%, lavada y centrifugada. La suspensión se sometió a tratamiento ultrasónico, lavada con PBS y transferido a viales estériles, conservados a 4°C. Se añadió a cada pocito 100 µL del antígeno *L. biflexa* serogrupo *Semaranga*, serovar *Patoc* diluido 1/1024.

El sistema comprendió la adsorción inicial (sensibilización) de un antígeno a una fase sólida. El antígeno fue incubado en esta fase sólida o soporte sensibilizado, seguido por la adición de 100 µL de la muestra e igual cantidad de conjugado (proteína A peroxidasa) diluido 1/1000 en solución de leche descremada al 1%. Posteriormente se adicionó 100 µL del sustrato (ortophenil-peróxido) y al revelarse la reacción enzimasustrato, se detuvo la reacción con 50µL de Solución de *Stock* (Ácido Sulfúrico 2,5 N) y se realizó la lectura con un Lector de Placas MultiScan a una longitud de onda de 492 nm. Los excesos de inmunoreactivos en cada paso del proceso descrito fueron eliminados mediante lavados con PBS. Se consideró positivo (+) cuando el promedio de la lectura en los 2 pozos es superior o igual que el punto de corte, (0.2) y negativo (-) cuando el promedio está por debajo de ese valor, en una dilución de 1/100.

Todas las determinaciones por la técnica ELISA fueron realizadas en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de acuerdo con los procedimientos operacionales establecidos.

Procesamiento de los datos

Los resultados del estudio para cada grupo se presentan por separado en Tablas de Contingencia de 2 x 2. Fueron determinadas las variables sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos, negativos, las prevalencias verdadera y aparente y el Coeficiente Kappa mediante el programa WinEpiscope 2.0. Los resultados obtenidos en ambos grupos se compararon mediante la prueba de Chi cuadrado con un nivel de significación del 95%, para lo cual se utilizó el paquete estadístico EpiDat (Versión 3.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 77 animales investigados en el Grupo 1, 28 fueron positivos por MAT y 30 por ELISA, lo que confirma lo planteado por varios autores (8, 9) relacionado

con la inespecificidad de los síntomas clínicos ya que a pesar de que estos animales fueron llevados a las Clínicas Veterinarias por sospecha de la enfermedad, la prevalencia verdadera aportada por el MAT resultó ser de 36,3%. Este valor fue similar a la prevalencia aparente encontrada con el ELISA que fue de 38,9%. Por otra parte, en animales aparentemente sanos (Grupo 2) la prevalencia verdadera y aparente fueron similares (36,9% y 38,1%, respectivamente) lo que indica, la concordancia entre ambos métodos y la existencia de una amplia circulación de cepas de leptospirosis en animales clínicamente sanos. Estos resultados son similares a los encontrados en Yucatán, México (35%) en perros recogidos en la calle (14); superiores al 7,3% reportado en el sur de China (16), 4,7% en Sudáfrica (17), 7,05 % en Brasil (18) e inferiores al 100% reportado en Aragua, Venezuela (19). Estas diferencias pueden ser atribuidas a varios factores como son: uso de diferentes métodos de diagnóstico, tamaño de muestras, tipo de poblaciones caninas y condiciones climáticas.

En los sueros de caninos del Grupo 1, fueron identificados con el MAT, *L. Ballum* en 12 muestras (17%), y *L. Canicola* en 12 muestras (17%) y en menor proporción *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* y *Australis*. En el Grupo 2 predominó, al igual que en el Grupo 1, *L. Canicola*, con 15 muestras (13%) y a diferencia del anterior en este grupo se identificó *L. Pomona*, en 9 muestras (8%) y en el resto casos aislados de *L. Australis*, *Ballum* e *Icterohaemorrhagiae*.

Resultados similares fueron obtenidos por Duarte (20) al reportar la identificación mediante el empleo del MAT de los serovares antes mencionados como los más frecuentes en nuestro país. Es de destacar la presencia en la población canina de *L. ballum* en el 17% de las muestras y su circulación en los animales procedentes de las clínicas caninas; debemos considerar que este serovar no está incluido en la vacuna que se comercializa en el país. Cambios en los serovares de *Leptospira* han sido reportados en varios países, lo que ha motivado la propuesta de inclusión de estos en la composición de las vacunas utilizadas (3, 21).

La técnica de ELISA indirecto en las muestras de suero de los animales procedentes de las clínicas veterinarias, mostró coincidencia como verdaderos positivos en 26 sueros y en 45 como verdaderos negativos, para un total de 71 resultados coincidentes (Tabla 1) de los 77 sueros analizados (92,2%).

Resultados similares fueron obtenidos por este método en los caninos aparentemente sanos, al mostrar a 28 sueros como verdaderos positivos y 49 como verdaderos negativos (Tabla 2), para un total de 77 resultados coincidentes (91,6%).

TABLA 1. Resultados del análisis de las muestras de suero de caninos provenientes de las clínicas veterinarias (Grupo 1)./ *Result of dog blood serum samples from veterinary clinics (Group 1).*

ELISA	MAT		Total
	+	-	
+	26	4	30
-	2	45	47
Total	28	49	77

TABLA 2. Resultados del análisis de las muestras de sueros de cánidos provenientes del Asilo Canino (Grupo 2)./ *Result of dog blood serum samples from the canine asylum (Group 2).*

ELISA	MAT		Total
	+	-	
+	28	4	32
-	3	49	52
Total	31	53	84

Dos y cuatro muestras respectivamente resultaron positivas al MAT y negativas al ELISA en los Grupos 1 y 2, respectivamente, lo cual puede ser debido a falsos negativos del ELISA o falsos positivos al MAT.

Las cuatro muestras negativas por MAT, que resultaron reactivas al ELISA en ambas poblaciones, podrían constituir falsos positivos de esta técnica por detección de anticuerpos inespecíficos, o bien, deberse a una mayor sensibilidad de esta técnica respecto a la MAT, ya que el ELISA es capaz de detectar anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes (22), estos últimos han sido identificados en caninos en las etapas tempranas de la infección (23), además, debido a la naturaleza de la prueba, un ensayo de aglutinación, requiere cierta cantidad de anticuerpos de superficie para que los

grupos de bacterias puedan ser visualizados con el microscopio de campo oscuro (24).

Debido a lo anteriormente expuesto, resultados discordantes han sido obtenidos entre diferentes laboratorios, en caninos recientemente vacunados y en casos de leptospirosis clínica y dentro de un mismo individuo los resultados pueden variar con el tiempo en dependencia de la etapa de desarrollo de la infección (25).

El ELISA en las condiciones de este estudio mostró una sensibilidad relativa de 92,8% y una especificidad relativa de 91,8%, en animales con sospecha clínica de la enfermedad y una sensibilidad de 90,3% y una especificidad de 92,4% en animales sanos, al ser comparado con la técnica de MAT, lo que lo hace de valor en el diagnóstico de la enfermedad en esta especie (Tabla 3). El Coeficiente Kappa (0,80) evidenció la concordancia entre ambas técnicas. El análisis comparativo entre ambos grupos no mostró diferencias significativas.

Los resultados del ELISA pueden variar en dependencia del antígeno utilizado. Varios ensayos con células completas que utilizan diferentes serovares han sido desarrollados con resultados satisfactorios, al ser evaluados en varias especies animales, así un ELISA, que utiliza como antígeno el extracto sonificado de un cultivo serovar *Hardjo* (cepa Hardjoprajitno) fue evaluado en bovinos, la sensibilidad del ELISA frente a MAT fue de 99,4% y la especificidad de 96,1% con un coeficiente kappa de 0,96 (26). Un ELISA indirecto en caninos elaborado a partir de *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* obtuvo una sensibilidad relativa de 95,6% y una especificidad de 100% (23). En los últimos años se han desarrollado técnicas ELISA a partir de proteínas recombinantes como antígenos (OmpL1, LipL32, LipL36) con resultados variables en dependencia de la proteína utilizada (27,28,29).

El empleo del antígeno del serovar *Patoc* del serogrupo *Semarang* empleado en este estudio fue capaz de reaccionar con los anticuerpos presentes en

TABLA 3. Resultados comparativos del ELISA indirecto/MAT en caninos con sospecha de leptospirosis (Grupo 1) y sanos (Grupo 2)./ *Comparative results of indirect ELISA/MAT in dogs with leptospirosis suspicion (Group 1) and healthy animals (Group 2).*

	Grupo 1	IC	Grupo 2	IC
Sensibilidad	92,8%	83,3-100	90,3%	79,9-100
Especificidad	91,8%	84,2-99,5	92,4%	85,3-99,5
Valor predictivo positivo	86,6%	74,5-99,8	87,5%	76,0-98,9
Valor predictivo negativo	95,7%	89,9-100	94,2%	87,9-100
Coeficiente Kappa	0,8		0,79	

IC: Intervalo de confianza

el suero, indicando la efectividad de la cepa para el diagnóstico serológico en poblaciones caninas. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores al emplear esta cepa en ensayos en el diagnóstico de leptospirosis humana (30). Se recomienda continuar el desarrollo y evaluación de este ELISA con el fin de incluirlo en el algoritmo diagnóstico de la leptospirosis canina.

REFERENCIAS

1. Dechet AM, Parsons M, Rambaran M, Mohamed-Rambaran P, Florendo-Cumbermack A, Persaud S, et al. Leptospirosis Outbreak following Severe Flooding: A Rapid Assessment and Mass Prophylaxis Campaign; Guyana, January-February 2005. *PLoS One*. 2012;7(7):e39672.
2. Zúñiga Carrasco IR, Baeza B, Bernal A, Muñoz W, Domínguez M. Casos de leptospirosis posterior a la gran inundación en el Municipio de Centro, Estado de Tabasco, 2007. *Enf Inf Microbiol*. 2011;31(1):33-37.
3. Ellis WA. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec*. 2010;167(16):602-605.
4. Verdasquera D, Rodríguez I, Obregón AM, Fernández C, Segura R, et al. Brote de leptospirosis humana en la provincia de Guantánamo. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;59(1):24-29.
5. Soca M, Suárez Y, Soca M, Amaro B, Romero A, et al. Technical bases for risk analysis of zoonotic and foodborne diseases associated to natural disasters in a community of Havana City. *Rev Salud Anim*. 2007;29(2):136.
6. Méndez ZC, Benavides PL, Esquivel HA, Aldama OA, Torres BJ, Gavaldón RD, et al. Pesquisa serológica de *Leptospira* en roedores silvestres, bovinos, equinos y caninos en el noreste de México. *Rev Salud Anim*. 2013;35(1): 1-8.
7. Silva RF, Riedemann S. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch Med Vet*. 2007;39(3):269-274.
8. Bal AM, Krakani AL, Bharadwaj RS, Kagal AS, Joshi SA, Arjunwadker VP. Evaluation of clinical criteria for the diagnosis of leptospirosis. *J Assoc Physicians India*. 2002;50:394-396.
9. Goldstein RE. Canine leptospirosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2010;40(6):1091-1101.
10. Norma Ramal. Leptospirosis. Diagnóstico de Laboratorio. Rectificación. Nrag-673. 1994. MINAGRI, Cuba.
11. OIE. Leptospirosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Capítulo 2.1.9:186-190. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.09.%20Leptospirosis.pdf. Revisado: 6 de diciembre de 2012.
12. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med*. 2011;25:1-13.
13. Vanasco NB, Lottersberger L, Sequeira MD, Tarabla H. Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Vet Microbiol*. 2001;82:321-330.
14. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ra Edición Volumen 1. Bacteriosis y Micosis Publicación Científica No. 580 OPS. 2003:175-184
15. Jiménez-Coello M, Vado-Solis I, Cárdenas-Marrufo MF, Rodríguez-Buenfil JC, Ortega-Pacheco A. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan, Mexico using two different tests. *Acta Trópica*. 2008;106(1):22-26.
16. Shi D, Liu M, Guo S, Liao S, Sun M, Liu J, et al. Serological Survey of Canine Leptospirosis in Southern China. *Pak Vet J*. 2012;32. Disponible en: <http://www.pvj.com.pk>. Revisado: 6 de diciembre de 2012.
17. Roach JM, van Vuuren M, Picard JA. A serological survey of antibodies to *Leptospira* species in dogs in South Africa. *J S Afr Vet Assoc*. 2010; 81:156-159.
18. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host

- for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:1305-1309.
19. Medina Z, Guerra M, Veliz N. Estudio Serológico de leptospirosis en caninos de un albergue en el estado Aragua. *Rev Fac Cs Vets UCV*. 2010;51(2):93-97.
 20. Duarte C. Experiencia cubana en el diagnóstico bacteriológico de la leptospirosis en animales. Zoonosis bacterianas de impacto para los países de América Latina. Seminario-Taller. 2004, p.30.
 21. Ambily R, Mini M, Joseph S, Krishna SV, Abhinay G. Canine leptospirosis - a seroprevalence study from Kerala, India. *Vet World*. 2013;6(1):42-44.
 22. Ribotta MJ, Higgins R, Gottschalk M, Lallier R. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Can J Vet Res*. 2000;64(1):32-37.
 23. Hartman EG, Van Houten M, Van der Donk JA, Frik JF. Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Immunol Immunopathol* 1984;7:33-42.
 24. Saengjaruk P, Sakolvaree Y, Maneewatch S, Tomanakan K, Tongtawe P, et al. Components of pathogenic *Leptospira* spp. with potentials for diagnosis of human leptospirosis. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2007;25(4):225-232.
 25. Miller MD, Annis KM, Lappin MR, LunnKF. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *J Vet Intern Med*. 2011;25(3):426-432.
 26. Lottersberger J, Pauli R, Vanasco NB. Desarrollo y validación de un enzimoimmunoensayo para el diagnóstico de Leptospirosis bovina. *Arch Med Vet*. 2002;34(1).
 27. Dey S, Mohan CM, Ramadass P, Nachimuthu K. Recombinant antigen-based dipstick ELISA for a diagnosis of leptospirosis in dog. *Vet Rec*. 2007;160(6):166-168.
 28. La-Ard A, Amavisit P, Sukpuaram T, Wajjwalku W. Evaluation of recombinant Lig antigen-based ELISA for detection of leptospiral antibodies in canine sera. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011;42(1):128-137.
 29. Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Jones MY, Mizuno T, et al. Nation wide survey of leptospira antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med Sci*. 2009;71(9):1191-1199.
 30. Obregón AM, Fernández C, Martínez I, Llop A, Rodríguez I, Rodríguez J, et al. Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 2011;63(3):239-245.

Recibido: 29-1-2013.

Aceptado: 27-1-2014.