

DetECCIÓN de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en equinos dedicados a la producción de sueros hiperinmunes

Margarita López Pérez *
Carlos Ortega Sánchez **
Daniel Atilano López ***
Alejandro de la Peña Moctezuma ***

Abstract

Sera from 106, one to 21 year old horses coming from the "Instituto Nacional de Higiene" in Mexico, which were used for hiperimmune antisera production, were analyzed for the microscopic agglutination test (MAT) with 19 serovars of *L. interrogans*. Taking into consideration the animal immunological state, sera with titers 1:400 were examined by the double agar immunodifusion test (DIT) and counterimmunoelectroforesis (CIEF) to discard inespecific reactions. In addition, 5 rabbits were inoculated with the antigens used in horses (rabies virus; tetanic and diphteric toxoids and scorpion and snake poisons), and their sera was tested for the MAT. Eighty eight out of 106 horses (83%) were positive for one or more serovars showing titers up to 1:6400. Serovars showing more positive reactions were: *autumnalis*, *australis* and *pomona*. Serovars with the highest titers were: *autumnalis*, *cynopteri* and *pyrogenes* (1:6400), and *australis*, *celledoni*, *szwajizak* and *icterohaemorrhagiae* (1:3200). DIT detected one case of total immunological identity among rabies virus and *L. pomona* (sample 545). CIEF did not detect any precipitation lines. None of the rabbit sera showed titers against *Leptospira*.

Key words: LEPTOSPIRA, ANTIBODY, ANTISERA, HORSE.

Resumen

Sueros de 106 equinos de 1 a 21 años (89 machos y 17 hembras), procedentes del Instituto Nacional de Higiene y dedicados a producir sueros hiperinmunes, fueron analizados por aglutinación microscópica (AM) contra 19 serovariedades de *L. interrogans*. Considerando el estado inmunológico de los equinos, se examinaron sueros con títulos 1:400 mediante inmunodifusión doble en agar (IDD) y contrainmunolectroforesis (CIEF), para descartar reacciones inespecíficas. Con el mismo fin, se inocularon conejos con los antígenos utilizados en los equinos (virus rábico, toxoides tetánico y diftérico y venenos de alacrán y víbora) y se probaron por AM. Con reacciones 1:100, 83% de los equinos (88 de 106) fueron positivos a una o más serovariedades con títulos de hasta 1:6400. Las serovariedades con más reacciones positivas fueron: *autumnalis*, *australis* y *pomona*. Las serovariedades con títulos más altos fueron: *autumnalis*, *cynopteri* y *pyrogenes* (1:6400) y *australis*, *celledoni*, *szwajizak* e *icterohaemorrhagiae* (1:3200). La IDD detectó un caso de identidad inmunológica total entre virus rábico y *L. pomona* (suero 545). La

Recibido el 9 de mayo de 1997 y aceptado el 19 de noviembre de 1997.

* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Tecoloyucan, Km 2.5, San Sebastián Xhala, 54700, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

** Sección Veterinaria, Instituto Nacional de Higiene, Gerencia General de Biológicos y Reactivos, Secretaría de Salud, Temacac, Estado de México.

*** Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

CIEF no detectó líneas de precipitación. Ninguno de los conejos inmunizados mostró títulos contra leptospira.

Palabras clave: *LEPTOSPIRA*, ANTICUERPO, ANTISUERO, EQUINO.

Introducción

El Instituto Nacional de Higiene (INH) de la Secretaría de Salud tiene entre otras funciones, producir sueros y vacunas destinados a prevenir, tratar y diagnosticar diversas enfermedades epidémicas y endémicas.¹ Los animales de elección para la producción de sueros hiperinmunes son los caballos; esto se debe a ciertas características como la obtención de sangrías hasta de 7 litros diarios durante 2 o 3 días consecutivos, periodos prolongados para mantener títulos altos de anticuerpos, la rápida sedimentación de glóbulos rojos que favorece el proceso de plasmaféresis (la transfusión al caballo del paquete celular suspendido en solución salina después de extraerse el plasma), así como la relativa tolerancia del organismo del hombre al suero de esta especie.¹ Debido a este manejo, los animales están expuestos a sufrir diferentes disfunciones orgánicas. Se observan lesiones recurrentes como: oftalmías periódicas, neumonías, nefritis, glomerulonefritis, cirrosis, hepatomegalia, hepatitis y anemias, las cuales obedecen principalmente a las constantes estimulación antigénica y sangrías.¹ Por otro lado, agentes infecciosos como leptospira pueden asociarse a algunas de estas lesiones.^{2, 3, 4, 5, 6, 7} La leptospirosis es una enfermedad bacteriana de distribución mundial, que afecta a los humanos y diversos mamíferos silvestres y domésticos, causada por miembros del género *Leptospira*. La leptospirosis clínica se asocia más comúnmente con especies domésticas como los bovinos, cerdos, perros y pocas veces se registra en los pequeños rumiantes y equinos.^{8, 9, 10, 11} Sin embargo, estudios serológicos han revelado que la exposición de los equinos a leptospirosis es común, por lo que se consideran hospederos, particularmente de la serovariedad *bratislava*.^{5, 6, 12, 13, 14, 15} Con la finalidad de asociar las lesiones de oftalmía periódica e insuficiencias renales con posibles infecciones crónicas por leptospirosis, se realizó un estudio serológico en equinos dedicados a producir sueros hiperinmunes.

Material y métodos

Muestras de suero

Se sangraron 106 equinos de la Sección Veterinaria del Instituto Nacional de Higiene, ubicada en Tecamac,

* 160/-L10/0.22 P UTI 6/0.34 Leitz Wezlar Germany 559121.

** 466300-9901 (0.85/0.9) Carl Zeiss.

***Centrífuga Beckman modelo J2-21.

+ Sonicador Bronwill Biosonic.

Estado de México, México, utilizados para la producción de sueros hiperinmunes contra venenos de alacrán y de víbora (cascabel y nauyaca), toxinas tetánica y diftérica y virus de la rabia. Con las muestras se formaron lotes de acuerdo a los grupos de inmunización preestablecidos, y un grupo de animales no inmunizados, en su mayoría burros, fue considerado como testigo. Se tomaron muestras de 8 ml de sangre sin anticoagulante, que posteriormente se enviaron en refrigeración al laboratorio donde se obtuvo el suero mediante centrifugación. Los sueros se congelaron a -20°C hasta su uso.

Análisis de lesiones en equinos

Exámenes clínicos rutinarios de los equinos en estudio fueron realizados durante el momento de colección de muestras de suero. Por otro lado, se analizaron los expedientes disponibles de las necropsias realizadas a los animales que murieron durante los 12 meses posteriores a la colección de muestras de suero.

Prueba de aglutinación microscópica (AM)

La prueba se realizó según la técnica propuesta por Myers¹⁶ con 19 serovariedades de *L. interrogans* (Cuadro 1), proporcionadas por el Centro Panamericano de Zoonosis en 1989 y propiedad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las aglutinaciones se observaron con un objetivo 10X corto* y condensador de campo oscuro seco**, en un microscopio Carl Zeiss.

Preparación del antígeno soluble de leptospira

Cultivos de leptospirosis en medio Stuart de 5 a 7 días, contra las cuales se observaron títulos de anticuerpos 1:400, fueron centrifugados a 15 000 g/15 min.*** Al sedimento se le agregaron 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (SAF), se lavó y centrifugó nuevamente y se resuspendió en 1.5 ml de agua destilada estéril (pH 7). Con la finalidad de romper las células, se congelaron a -70°C durante 2 h y se descongelaron a temperatura ambiente por 8 veces, sometiéndolas posteriormente a ruptura sónica⁺ con una fuerza de 40 y tono de 4 durante 10 min. Se examinaron por microscopía de campo oscuro para confirmar la completa

Cuadro 1

LISTA DE SEROVARIEDADES DE *Leptospira interrogans* UTILIZADAS COMO ANTÍGENOS PARA LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA

Serogrupo	Serovariedades	Cepa
Australis	<i>australis</i>	Ballico
	<i>bratislava</i>	Bratislava
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
Ballum	<i>ballum</i>	Castellon 3
Bataviae	<i>bataviae</i>	Van tienen
	<i>paidjan</i>	Paidjan
Canicola	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
Celledoni	<i>celledoni</i>	Celledoni
Cynopteri	<i>cynopteri</i>	3522 C
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Hebdomalis
	<i>szwajizak</i>	IOWA
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGa
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
Serjoe	<i>hardjo</i>	Hardjo Prajitno
	<i>serjoe</i>	M- 84
	<i>wolffi</i>	3705
Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Perepelicin

Posteriormente se virtieron en un portaobjetos 4 ml, se dejó enfriar y se perforaron 2 filas de pozos. Se agregó el suero en la fila izquierda, y en la derecha los antígenos respectivos (Cuadro 2), así como las serovariedades de leptospira correspondientes. Se colocó el portaobjetos en la cámara de electroforesis, quedando los pozos con el antígeno del lado cercano al polo negativo y los pozos con suero del lado cercano al polo positivo. Se preparó la cámara húmeda* con SAF-TRIS - ácido acético a 0.5 mm de espesor; se puso un trozo de tela absorbente en cada lado del portaobjeto, de tal manera que una punta tocaba el agar y la otra quedaba sumergida en solución amortiguadora en la cámara de electroforesis (cada trozo de tela cierra el circuito para el paso de corriente). Se hizo el corrimiento a 400 milivoltios, esperando 30 min como prerreconido; transcurrido el tiempo, se desconectó la fuente de poder y se colocó el antígeno dejando correr 1.5 h, con el mismo voltaje. Se sumergió en solución salina fisiológica (SSF) y se realizó la lectura correspondiente después de 24 h.^{17,18}

Inmunización de conejos

Se inocularon 5 conejos con los antígenos utilizados para inmunizar a los equinos (Cuadro 2). Se les inoculó 0.5 ml de cada antígeno por vía subcutánea cada 7 días

desintegración de las leptospiras y se cuantificó el contenido de proteínas por el método Biuret estandarizando de 0.2 a 0.5 mg/ml de proteína.¹⁷

Inmunodifusión doble (IDD)

Para descartar cualquier posible reacción inespecífica debida al estado inmunológico de los equinos se utilizó la prueba IDD, usando los sueros de equinos con títulos 1:400.^{17,18} En el pozo central se agregó suero sin diluir y en los pozos periféricos, los diferentes antígenos en estudio (Cuadro 2) y las serovariedades de leptospira que reaccionaron en la AM, se incubaron a temperatura ambiente por 72 h y se lavaron con SSF.

Contrainmunolectroforesis (CIEF)

Se preparó agarosa al 0.3% con SAF-TRIS-ácido acético, calentada hasta observar la solución transparente.

* Cámara húmeda GELMAN-Instrument Company Ann Arbor Michigan.

Cuadro 2

ANTÍGENOS USADOS PARA LA OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES.

Toxoide tetánico	23 Lf / ml + S.S.F.
Toxoide diftérico	2, 000 Lf /ml + Cloruro de calcio, 0.5%.
Viperino	Cascabel/Nauyaca (<i>Crotalus baciliscus/ Bothrops aspers</i>) 8/16 DL 50/ml.
Alacrán	50 DL 50/ml + S.S.F. + Hidróxido de aluminio, 0.3%.
Rabia I, II:	Vacuna elaborada por la Secretaría de Salud (tejido nervioso de ratón lactante infectado con 3 cepas de virus rábico) (CVS de origen Pasteur, 52/123 aislada de cerebro canino y 91/122 aislada de cerebro humano) 10 partículas /ml inactivadas con luz ultravioleta + 0.025 tiomersal + 0.0001 Fenol + agua bidestilada 1 ml)
Rabiffa III, IV:	Virus rábico cepa PV- 11- PM (ongen Pasteur), cultivado en línea celular estable (NIL- 2) inactivado con betapropialactona con 10 ⁷ partículas /ml.

S.S.F. = Solución salina fisiológica.

Lf = Liofilizable.

DL = Dosis letal.

Cuadro 3

NÚMERO DE ANIMALES POSITIVOS EN LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA CONTRA LEPTOSPIRAS (N=100)

Núm. de animales.	Título de anticuerpos	%
88	≥ 1: 100	83
67	≥ 1: 200	63.2
49	≥ 1: 400	46.2
24	≥ 1: 800	22.6
14	≥ 1:1600	13.2
10	≥ 1:3200	9.4
3	≥ 1:6400	2.8

durante un mes. Al inicio del calendario y después de 4 días de la última inmunización, se tomaron muestras de

sangre sin anticoagulante y se desafiaron estos sueros contra leptospiras en la prueba de AM.¹⁶

Resultados

Se encontraron anticuerpos con títulos 1:100 contra por lo menos una serovariedad de leptospira en 83% de los equinos muestreados (88 de 106) (Cuadro 3). Las serovariedades más frecuentemente detectadas fueron: *autumnalis*, *australis*, *pomona* e *icterohaemorrhagiae* (Cuadro 4).

Otras serovariedades registradas con títulos más altos fueron *autumnalis*, *pyrogenes* y *cynopteri* (1:6400) y *australis*, *celledoni*, *szwajizak* e *icterohaemorrhagiae* (1:3200) (Cuadro 5). Por otro lado, 65 de los 88 sueros positivos reaccionaron con 2 o más serovariedades, lo que indica la posibilidad de infecciones mixtas o reacciones cruzadas entre serovariedades. Doce meses después de la toma de muestras de sueros, 53 (50%) equinos murieron por causas diversas, entre las que destacan parasitosis, insuficiencia renal, daño hepático y congestión pulmonar. Un resumen de las lesiones macroscópicas y microscópicas, así como los títulos de anticuerpos observados en 14 de esos 53 animales se presenta en el Cuadro 6.

Cuadro 4

SEROVARIIDADES DE *L.interrogans* DETECTADAS EN CADA GRUPO

Grupo:	<i>V. Alacrán</i>	<i>T. Diftérica</i>	<i>Vi. Rábico</i>	<i>T. Tetánica</i>	<i>V Viperino</i>	Testigo	Totales
Núm.de animales.	9	12	21	23	35	6	106
Positivos	9 (100%)	9 (75%)	16 (76.1%)	17 (73.9%)	33 (94.2%)	4 (66.6%)	88 (83%)
<i>australis</i>	2	2	1	10	15	0	30 (28.3%)
<i>autumna</i>	3	5	9	2	12	3	34 (32%)
<i>ballum</i>	3	2	6	0	4	2	17 (16%)
<i>bataviae</i>	1	0	2	1	4	0	8 (7.5%)
<i>bratislava</i>	2	2	5	5	4	0	18 (16.9%)
<i>canicola</i>	0	1	0	0	0	0	1 (.94%)
<i>celledoni</i>	0	0	3	2	0	1	6 (5.6%)
<i>cynopteri</i>	1	1	2	6	1	0	11 (10.3%)
<i>grippoty</i>	0	1	0	0	1	0	2 (1.8%)
<i>hardjo</i>	2	6	5	0	8	0	21 (19.8%)
<i>hebdoma</i>	0	1	0	1	1	0	3 (2.8%)
<i>icterohae</i>	2	2	2	6	12	2	26 (24.5%)
<i>paidjan</i>	1	0	0	1	1	4	7 (6.6%)
<i>pomona</i>	6	1	9	3	11	0	30 (28.3%)
<i>pyrogenes</i>	0	2	4	3	6	0	15 (14.1%)
<i>sejroe</i>	0	0	0	0	1	0	1 (.94%)
<i>szwajizak</i>	0	0	3	3	1	0	7 (6.6%)
<i>wolffi</i>	0	1	0	0	2	0	3 (2.8%)
<i>tarassovi</i>	0	0	0	1	2	0	3 (2.8%)

En las pruebas de IDD y CIEF, los antisueros de equinos inmunizados contra toxinas diftérica y tetánica, así como venenos de alacrán y viperino, dieron líneas densas de precipitación. Los resultados fueron negativos en CIEF para rabia y leptospiras, pero positivos en IDD. Esta última mostró un caso de identidad total entre los antígenos virus rábico y leptospira *pomona* correspondiente al suero del equino 545. No se encontraron líneas de precipitación ni de identidad inmunológica en IDD contra ninguna otra serovariedad de leptospira.

Los sueros de conejos, obtenidos después del calendario de inmunización con los antígenos utilizados en equinos, no mostraron anticuerpos aglutinantes contra leptospira en la prueba de AM.

Discusión

Diversos exámenes serológicos realizados en todo el mundo sugieren que los equinos adquieren la infección en forma natural. En México no se lleva a cabo la vacunación de equinos contra leptospirosis, por lo que los anticuerpos detectados indican el contacto con el antígeno en forma natural. Existe concordancia parcial entre las serovarietades que con más frecuencia se detectaron (*autumnalis*, *australis*, *pomona*, *icterohaemo-*

Cuadro 5	
SEROVARIETADES CON TÍTULOS MÁS ALTOS	
1: 6400	<i>autumnalis</i> <i>pyrogenes</i> <i>cynopteri</i>
1: 3200	<i>icterohaemorrhagiae</i> <i>australis</i> <i>szwajizak</i> <i>celledoni</i>

rrhagiae, *hardjo*, *bratislava*, *ballum* y *pyrogenes*) (Cuadro 4) y los resultados de Legorreta,¹⁹ quien detectó *pomona*, *bratislava* y *borincana* como las de más incidencia, además de registrar también *bataviae*, *pyrogenes*, *ballum* y *hardjo*.

Estudios serológicos han mostrado evidencia de infección subclínica por un amplio rango de serovarietades, incluyendo *hardjo* y *tarassovi* en Queensland² y *mitis*, *icterohaemorrhagiae* y *canicola* en Victoria.⁷ En un

Cuadro 6

RELACIÓN DE LAS LESIONES OBSERVADAS EN ALGUNOS DE LOS ANIMALES MUERTOS EN 12 MESES POSTERIORES A LA COLECCIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO Y LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTILEPTOSPIRA

Equino núm.	Lesiones observadas	Títulos AM
A518	Nefritis y hepatitis supurativas, necrosis focal, congestión pulmonar	1:400 <i>bal.</i>
D527	Hepatitis supurativa, congestión pulmonar, fístula perineal	1:200 <i>aut.</i>
D532	Hepatomegalia, esplenomegalia, trombosis hepática	1:100 <i>aus.</i> , <i>aut.</i> ; 1:200 <i>har.</i>
D535	Nefritis intersticial, miositis hemorrágica	NEG
R544	Hemorragia epidural y subdural	NEG
T501	Infarto renal, nefritis intersticial, GEH, trombo cava posterior	1:100 <i>cel.</i> , <i>pom.</i> ; 1:200 <i>aut.</i>
T503	Trombosis hepática, infarto renal, tiflitis hemorrágica	NEG
T505	GEH	1:100 <i>pom.</i> , <i>pyr.</i>
T514	Infarto renal, GEH	1:200 <i>aut.</i> ; 1:400 <i>gri.</i> ; 1:800 <i>bra.</i>
V7	Hepatopatía, nefropatía, congestión pulmonar, parasitosis	1:100 <i>aut.</i> , <i>bra.</i> , <i>pyr.</i> ; 1:200 <i>aus.</i> , <i>bat.</i> , <i>har.</i>
V9	Hepatitis fibrosa, congestión renal, GEH	1:100 <i>aus.</i> , <i>gri.</i> , <i>har.</i>
V92	Nefritis y hepatitis supurativas, congestión pulmonar.	1:100 <i>aut.</i> , <i>gri.</i> , <i>har.</i>
V109	Trombosis pulmonar	NEG
V552	Nefropatía, congestión pulmonar, GEH.	1:100 <i>aut.</i> ; 1:200 <i>aus.</i> ; 1:400 <i>ict</i>

S/D: Sin datos.

NEG: Negativo.

GEH: Gastroenteritis hemorrágica.

A: v. de alacrán, D: t. diftérica; R: v. rábico; T: t. tetánica; V: v. de víbora.

estudio realizado en Gran Bretaña, se detectaron reacciones hacia 14 serovariedades de leptospiras en equinos para la exportación.²⁰ A pesar de que se registró un 83% de seropositividad en este estudio serológico, se encontró un solo caso de uveítis unilateral izquierda con registro de títulos de 1:200 a *icterohaemorrhagiae*. La relación existente entre la lesión ocular y la presencia de leptospiras en líquidos oculares a través de microscopía de campo oscuro ha sido documentada con anterioridad.^{21, 22, 23, 24}

En el presente estudio *bratislava* representó el 16.9% de seropositividad con 18 animales positivos; sin embargo, considerando la posibilidad de reacciones cruzadas con la serovariedad *australis* (28.3%), perteneciente al mismo serogrupo Australis (Cuadro 1), la combinación de resultados coloca al serogrupo como el más representativo con un 45.2%, concordando con informes previos que consideran a *bratislava* como la más representativa en equinos.⁶

En cuanto a *icterohaemorrhagiae* y *ballum*, se detectaron 24.5% y 16% de reactores positivos para estas serovariedades, respectivamente. En la rata (*Ratus norvegicus*) se ha encontrado predominantemente la serovariedad *icterohaemorrhagiae*, en tanto que el portador primario de *ballum* es el ratón (*Mus musculus*).⁵ Estos resultados permiten considerar que las reacciones positivas a estas serovariedades se deben a la presencia de roedores, lo que es un hecho en las condiciones que se encontraban los equinos en estudio.

Para la serovariedad *pomona* se detectó un 28.3% de seropositividad, que resulta bajo en comparación con los resultados del trabajo realizado por Shimada,²⁵ quien encontró un 70% de seropositividad a la misma serovariedad en una población de equinos del D.F. La serovariedad *pomona* ha sido asociada en otros estudios como causa de abortos, retención placentaria, muerte neonatal, así como uveítis.^{13, 20, 25, 26}

Las infecciones cruzadas entre bovinos y equinos se encuentran documentadas.²⁷ Algunos de los caballos muestreados eran procedentes de establos lecheros lo que presupone el contacto con excretas de bovinos, especie animal considerada como el principal portador de la serovariedad *hardjo*.^{11, 28} Esto podría explicar el hecho de que 19.8% de los equinos de este estudio resultaron positivos a dicha serovariedad.

En cuanto a los resultados obtenidos en las pruebas de IDD y CIEF, sólo se detectó un caso de identidad total rabiapomona (suero 545). No fue posible determinar la razón de dicha identidad y no se observó ningún otro caso similar entre los equinos del mismo grupo, ni ninguno de los sueros antiviral rábico mostró identidad inmunológica contra alguna serovariedad de leptospira.

Los antisueros preparados en conejos demostraron que no existe reacción cruzada entre los anticuerpos contra los antígenos utilizados en equinos (Cuadro 2) y los antígenos de leptospira usados en la AM (Cuadro 1).

Referencias

1. Barragán SC. Estudios morfológicos de caballos productores de sueros hiperinmunes procedentes del Instituto Nacional de Higiene (tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli (Edo. de México) México: Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. UNAM, 1992.
2. Kirkman DB, Campbell RSF, Miller RI. Observation on equine leptospirosis. Austr Vet J 1983;59:124.
3. Davidson MG, Nasisse MP, Roberts SM. Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses. Equine Vet J 1987;19:155-157.
4. Hogg GG. The isolation of *Leptospira pomona* from a sick foal. Austr Vet J 1974;50:326.
5. Halliwell RE, Brim TA, Hines MT. Studies on equine recurrent uveitis II: The role of infection with *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. Curr Eye Res 1985;4:1033-1040.
6. Bernard WV. Leptospirosis. Vet Clin North Am Equine Pract 1993;9:435-444.
7. Hollet RB. Equine leptospirosis. Equine Vet Data 1991; 12:210-211.
8. Acha PN. Zoonosis. Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a ed. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud, 1986.
9. Higgins R, Coyovette P. Serological diagnosis of leptospirosis in the Province of Quebec. Can Vet J 1978;9:13-16.
10. Ellis WA, MacFarland PJ, Bryson DG. Isolation of leptospirae from the genital tract and kidneys of aborted sows. Vet Rec 1986;118:294-295.
11. Thiermann AB. Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. Am J Vet Res 1983;44:2244-2245.
12. Divers TJ, Bryans TD, Shin SJ. Renal dysfunction associated with infection of *Leptospira interrogans* in a horse. J Am Vet Med Assoc 1992;201:1391-1392.
13. Egan J, Yearsley D. A serological survey of leptospiral infection in horses in the Republic of Ireland. Vet Rec 1986;119:306.
14. Kitson-Piggott AW, Prescott JF. Leptospirosis in horses in Ontario. Can J Vet Res 1987;51:448-451.
15. Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells JA. Leptospiral infection in horse in Northern Ireland: serological and microbiological findings. Equine Vet J 1983;15:317-320.
16. Myers DM. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Buenos Aires, Argentina: OPS/OMS, 1985.
17. Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. Methods in immunology. A laboratory text for instruction and research. 3rd ed. Reading (MA): WA Benjamin Inc., 1977.
18. Crowle AJ. Immunodiffusion. 2nd ed. New York: Academic Press, 1973.
19. Legorreta PJ. Exploración serológica de leptospirosis equina en el D.F. utilizando 19 serotipos (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1972.
20. Hathaway SC, Little TW, Finch SM, Stevens AE. Leptospiral infection in horses in England: a serological study. Vet Rec 1981;108:396-398.
21. Cacchione RA, Cascelli E, Saravi M, Martínez E, Carreras FF, Niizawa M. Leptospirosis equina: estudio serológico y epizootiología en animales del ejército de Argentina. Rev Militar Vet 1976; 23:86-95.
22. Carpio MM, Iverson JO. A serological survey of *Leptospira interrogans* serotype *pomona* in Saskatchewan horses. Can Vet J 1979; 20:127-130.
23. Campos TJM. Contribución a la investigación de leptospiras por microscopía en líquidos oculares de caballos con iridociclitis, positivos a la aglutinación rápida en pla-

- ca (tesis de licenciatura). México (D.F.) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1964.
24. Schwing KL, Crissman M, Rigg DL. Chronic recurrent uveitis in a horse with an elevated aqueous humour antibody titer to *Leptospira interrogans* serovar *autumnalis*. *Equine Pract* 1989;11:41-43.
 25. Shimada MA. Incidencia de aglutinación contra *Leptospira pomona* encontradas en caballos del D.F. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1964.
 26. Sillerud CL, Bey RF, Ball M. Serological correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar *pomona* induced uveitis in a group of horses. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:1576-1578.
 27. Swan RA, Williams ES, Taylor EG. Clinical and serological observation on horses with suspected leptospirosis. *Austr Vet J* 1981;57:528-529.
 28. Swart KS, Calvery K, Meney C. The prevalence of antibodies to serovars of *Leptospira interrogans* in horses. *Austr Vet J* 1982;59:25-27.