

241123



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LEPTOSPIROSIS EN SANGRE DE HUMANOS.

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a

CARLOS DAVID HARRIS PEREZ RINCON



Asesores: M.V.Z. Reyna Sánchez S.
M.V.Z. Lemuel León L.

México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

R E S U M E N

HARRIS PEREZ RINCON CARLOS DAVID. Diagnóstico Serológico de Leptospirosis en sangre de humanos (bajo la dirección de: Reyna Sanchez San Martin y Lemuel Leon Lara).

Se practicó la prueba de Microaglutinación a 100 muestras de suero humano donadas por el Centro de Salud de la S.S.A. ubicado en el ejido de Padierna Villa Coapa, D.F., para el diagnóstico de Leptospirosis. 11 muestras resultaron positivas, siendo los serotipos más frecuentes: L. hardjo, L. pyrogenes y L. canicola. 5 de los sueros positivos, correspondieron a individuos menores de edad. Se realizó una comparación de los valores de microaglutinación a Leptospirosis en perros. Se sugiere realizar un estudio más amplio para conocer la magnitud del problema.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	ii
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	10
OBJETIVO	10
MATERIAL Y	
METODOS	11
RESULTADOS	12
DISCUSION	14
CONCLUSIONES	18
LITERATURA	
CITADA	19

INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo, se ha dado importancia a la transmisión de algunas enfermedades de los animales hacia el hombre, como por ejemplo la Rabia, a la cual se le ha considerado en primer lugar, por el alto riesgo que presenta para todos los dueños de mascotas. Esto los obliga a tomar medidas profilácticas contra tal enfermedad. Sin embargo, se ha visto que para los perros no existe en la mayoría de los casos una buena profilaxis que los prevenga de ser portadores y transmisores de otras enfermedades. Es posible enlistar una serie de agentes infecto-contagiosos tanto parasitarios, bacterianos como virales (moquillo canino, ectoparásitos) en perros callejeros, y de mascotas, con más riesgo el primer grupo, que en forma habitual conviven con grandes grupos de personas. Entre las enfermedades bacterianas se encontró la Leptospirosis(13), cuyo agente etiológico, se elimina a través de la orina en forma intermitente, lo que puede ocasionar la diseminación de la enfermedad a otros animales y al hombre principalmente (6,13, 18,26).

Esta enfermedad se ha diagnosticado en otros animales domésticos como el cerdo y en animales de zoológico, lo que implica un riesgo de contagio a personas; como es el caso de

osos en cautiverio los cuales llegan a infectar al hombre (4, 11,16,22,26).

En un estudio que hizo Harrington analizó 538 sueros de venado, encontró que 48 eran positivos a *L. australis* (19).

Aspectos Históricos de la Leptospirosis

El conocimiento de la leptospira se inicia en 1912, con Krumbein y Frieling, quienes reportan el primer caso de leptospirosis canina (28). En 1915, los investigadores Ido e Ihada en Japón aislaron el agente causal de la enfermedad de Weil, y en 1917, Noguchi le da el nombre de Leptospira icterohaemorrhagiae al agente causal de ésta enfermedad. En 1911, Klarenbeck y Schuffner, utilizan la técnica de macro-aglutinación en placa y comprobaron que el agente causal de la leptospirosis canina, actualmente llamada: L. canicola difería en un alto porcentaje serológicamente de las cepas clásicas. En 1918, otra leptospira (L. hebdomadis) fué identificada como la causa de una enfermedad en humanos, conocida como "fiebre de los 7 días".

Más tarde, en 1925, un tercer microorganismo (L. autumnalis) fué encontrado en Japón durante el otoño (6).

En 1970, Ryu y Taiwan, reportan el método de microaglutinación rápida como medio de investigación de anticuerpos contra lep-

tospirósis (13,20,21) .

Clasificación y Morfología de la Leptospira

Dentro del orden Spirochaetae se comprenden las familias Spirochaetacea y Treponemataceae; en ésta última familia, se clasifica la leptospira junto con los géneros Borrelia y Treponema. El género leptospira se divide en dos especies: L. interrogans en el cual se incluyen los serotipos patógenos y L. biflexa , que incluye los serotipos saprófitos.

Con base en su estructura antigénica, se ha dividido en 120 serotipos diferentes, los cuales se encuentran agrupados en 18 serogrupos (6) .

Morfológicamente estos gérmenes son flexibles, delgados, enrollados; miden de 5 a 15 micras de longitud y de 0.1 a 0.2 micras de diámetro; en uno de sus extremos, a menudo se forma un gancho, giran sobre su propio eje y poseen un filamento axial (13) .

Epidemiología de la Enfermedad

La epidemiología de la enfermedad, es de distribución mundial, teniendo una serie de factores predisponentes para su desarrollo en el medio ambiente, entre los cuales encontramos: la humedad, (en Brazil se presentaron varios brotes en humanos, debido a inundaciones de ciudades) (1) . Una temperatura

entre 20 a 35°C, así como un pH neutro o ligeramente alcalino, facilita su crecimiento en el suelo y agua. Existe una correlación positiva entre la época de lluvia y el aumento de la incidencia de la enfermedad, dato que reporta Da Silva en un estudio epidemiológico de 380 casos presentados en época de lluvia (12,31).

Por medio de la congelación, este germen puede mantenerse vivo durante 20 días dentro de los tejidos infectados. En estudios de tejidos, se ha encontrado que éste microorganismo se localiza en el riñón, particularmente en los túbulos contorneados, siendo excretados intermitentemente en la orina que puede contener varios millones de microorganismos por ml (6,13,18, 30).

Los riesgos de infección aumentan en aquellas zonas en donde las condiciones de manejo e higiene permiten la contaminación de alimentos y agua de bebida así como la presencia de perros que acostumbran olfatear y lamer objetos contaminados de orina infectada (6).

Cachione notificó algunos brotes que tenían como fuente de infección común, el agua de ríos y arroyos contaminados por orina de animales domésticos. La mayoría de los brotes se debieron a: L. pomona (32).

En Porto alegre, (1941), hubo una epidemia en la que se presentaron 45 casos de los cuales 5 fueron mortales y en la Colonia Marqués de Abramante, estado de Paraná, 180 personas se enfermaron y 44 murieron por ésta misma causa (32).

Otra forma como puede ser transmitida la leptospirosis es por medio de los roedores, ya que en 1974 Sullivan reporta que estos animales son los principales transmisores de L. icterohaemorrhagiae como agente etiológico de la enfermedad de Weil; aunque también se reportan en Queensland los serogrupos: L. australis y L. tarassovi aislados de ratas. Stallman (1972), reporta el aislamiento de L. hardjo de un paciente (21,27). Myers aisló una leptospira de una rata y la clasificó como fortbragg perteneciente al serogrupo autumnalis (27).

Sostaric (1981), en un estudio de 50 ratas (Rattus norvegicus) del Rastro de Ferrería de la Ciudad de México, aisló: L. australis, L. bratislava, L. icterohaemorrhagiae, L. louisiana, L. pomona y L. wolffii, que pueden ser depositadas en la carne y otros productos de consumo humano (30).

Como el mecanismo de infección de este patógeno participa de diversos factores de transmisión, la vía de infección no es exacta, ya que en algunos brotes, la ruta de infección no ha sido aparente. Inada propone, que es por la vía diges-

tiva por un desgaste de la mucosa oral, conjuntival o nasal, así como zonas de la piel que han sido dañadas o reblandecidas por un contacto constante con el agua y lodo (6,31). En Baytown Texas, Barkin señaló siete casos de niños con leptospirosis contraída de una alberca contaminada por perros; mediante pruebas serológicas se comprobó que se trataba de L. pomona (2).

La problemática de la leptospirosis en los perros se debe a que se pueden comportar como portadores sanos o bien presentar estados febriles subclínicos y por otra parte, dentro del examen clínico no se les practica en forma rutinaria las pruebas correspondientes ya que en forma práctica su diagnóstico es difícil (19,27).

Estudios realizados en México por Varela (34), se inician con la detección de anticuerpos contra Leptospira canicola y Leptospira icterohaemorrhagiae en 59 sueros de canideo, encontrando un 37.3% de sueros positivos.

En 1965, González L.G. detectó un 41.7% de sueros positivos a L. canicola en 326 muestras de perros callejeros (17).

En el caso de los caninos, se pueden apreciar 4 cuadros clínicos que son: hemorrágico agudo, icterico, subagudo o urémico, e inaparente. Los primeros dos son causados principal-

mente por L. icterohaemorrhagiae, mientras que los dos últimos son causados por L. canicola. En las etapas iniciales de la enfermedad, las 3 primeras formas de leptospirosis son clínicamente indistinguibles, se caracterizan por depresión, anorexia, vómito y diarrea o constipación, mientras que la cuarta forma no muestra manifestaciones clínicas (7).

Por otra parte, se ha señalado que muchas leptospiras inmunológicamente distintas, causan diferentes enfermedades en humanos, la mayor parte de las cuales no originan ictericia. Además cada una de ellas parece tener un huésped natural diferente. Así, L. icterohaemorrhagiae se encuentra más frecuente en las ratas; L. canicola infecta habitualmente a los perros (11).

Características Clínicas de la enfermedad

En cuanto al brote de la enfermedad en el hombre, Fiedler divide la patogenie en 3 etapas(20):

- 1.- Período de incubación: de 5 a 9 días, máximo 13. En ésta etapa, suele confundirse el diagnóstico con la fiebre amarilla o con la hepatitis infecciosa. Hay fiebre y bacteremia.
- 2.- Fase Ictérica: La leptospira se encuentra ya en orina y se producen los anticuerpos detectables en el suero de los pacientes.

3.- Fase de Convalecencia: Los síntomas van desapareciendo gradualmente, los anticuerpos alcanzan su máximo nivel en sangre y la leptospira abunda en orina.

La leptospira posee cierta antigenicidad cruzada, por lo cual aglutinan en el mismo suero, la mayoría de los serogrupos, pero a diferentes títulos. Algunos otros no aglutinan más que con su antígeno específico, por lo que requiere un método más sensible de serodiagnóstico (3,13,21).

Existen varios procedimientos para demostrar la presencia de anticuerpos por serodiagnóstico:

- 1.- Reacción en tubo capilar
- 2.- Prueba de fijación de complemento
- 3.- Prueba de hemoaglutinación
- 4.- Inmunofluorescencia
- 5.- Macroaglutinación en placa
- 6.- Microaglutinación

Esta última prueba es la más sensible, aún cuando está expuesta a error, principalmente por una particular respuesta del sistema inmunocompetente del paciente, o una interferencia de un serotipo poco usual no incluido en la batería de antígenos. Otra desventaja que presenta ésta prueba es el tener que trabajar con antígenos vivos, por lo cual hay que sembrar

subcultivos semanalmente y lo más importante es la posibilidad de una infección accidental de la persona que realiza el trabajo (3,13,21).

HIPOTESIS:

De acuerdo con lo anterior se estableció la hipótesis:

"El hecho de que el ser humano pueda presentar una respuesta serológica positiva a leptospirosis y que la posibilidad de infección provenga de animales como el perro y la rata."

OBJETIVO:

Los objetivos del presente trabajo son:

Demostrar la presencia de anticuerpos contra Leptospira spp. en una población humana, determinando el serotipo más frecuente de leptospirosis hallada en el grupo estudiado, así como obtener la relación de frecuencia de leptospirosis entre los canideos y los humanos.

MATERIAL Y METODOS

Para realizar es estudio se colectaron 100 muestrar al azar de sangre humana.

Las muestras de sangre fueron donadas por el Centro de Salud de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, ubicado en el ejido de Padierna, Villa Coapa, D.F.

El periodo de muestreo, fué del mes de septiembre de 1982 al mes de julio de 1983.

La recolección se realizó el lotes de 10 muestras cada uno, colectando la sangre con jeringas desechables y deposita da la cantidad de 2 ml. en tubos de vidrios esterilizados con tapón de goma.

La separación del suero se hizo en dos partes: primero se dejaron reposar las muestras en refrigeración y por decantación se separó el suero. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos, para una última separación utilizando pipetas Pasteur.

Se prepararon series de dilucione dobles (1:50 - 1:400) del suero con solución salina fisiológica estéril en placas excavadas. Se colocó 0.1 ml de cada dilución y 0.1 ml del antígeno. Se colocó en cámara húmeda y se incubaron por 2 horas a 30°C. Se examinó una gota colocada en portaobjetos

al microscopio de campo obscuro (9,13). Los serotipos utilizados para éste trabajo fueron los siguientes:

L. hardjo

L. hebdomadis

L. serjroe

L. wolffii

L. tarassovi

L. canicola

L. pyrogenes

L. gryppotyphosa

L. icterohaemorrhagiae

L. australis

L. botaviae

L. ballum

RESULTADOS

Asumiendo de que ninguna persona de las muestreadas en éste trabajo han recibido alguna vacunación contra Leptospira spp* se tomó como criterio que una muestra con un 25% de microaglutinación en una dilución 1/50, es considerada como altamente sospechosa. Con un 50% de microaglutinación a la misma dilución se tomó como positiva (3,9,13,18,28).

Las respuestas serológicas a los serotipos usados son las siguientes:

* Dato proporcionado por el control Médico del Centro de Salud.

<u>L. hardjo</u>	Suero (S) 37 (50%) S6 (50%) S59 (25%)
<u>L. hebdomadis</u>	-
<u>L. seriroe</u>	-
<u>L. wolffii</u>	-
<u>L. tarassovi</u>	-
<u>L. canicola</u>	S74 (50%) S83 (25%)
<u>L. pyrogenes</u>	S54 (75%) S11 (75%) S4 (25%)
<u>L. gryppotyphosa</u>	S98 (50%)
<u>L. icterohaemorrhagiae</u>	S74 (50%)
<u>L. australis</u>	S99 (25%)
<u>L. botaviae</u>	S17 (50%)
<u>L. ballum</u>	-

Los números de serie de los sueros trabajados, corresponden a las siguientes personas:

S4	Fem.	No. de Centro de Salud 5332
S6	Masc.	11 años
S11	Fem.	30 "
S17	Fem.	10 "
S37	Fem.	14 "
S54	Fem.	35 "
S59	Fem.	8 "
S74	Fem.	12 "
S83	Masc.	40 "
S98	Fem.	No. de Centro de Salud 4941
S99	Fem.	30 años

Dentro de las observaciones que se pueden considerar de los resultados obtenidos en éste trabajo, cabe mencionar las siguientes:

- 1°- De las 100 muestras trabajadas, se obtuvieron solo 11 casos positivos a la prueba de microaglutinación en placa, lo que corresponde al 11%.
- 2°- Si se consideran esos 11 casos como un 100 por ciento, se puede decir:
- | | | |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 4 sueros aglutinaron al (25%) | que corresponde a: | 36.36 % |
| 5 sueros aglutinaron al (50%) | que corresponde a: | 45.45 % |
| 2 sueros aglutinaron al (75%) | que corresponde a: | $\frac{18.18}{99.99}$ % |

DISCUSIONES

Los casos que aglutinaron al 25% se pueden considerar como individuos que han estado en contacto con la bacteria, o bien que presentaron un cuadro subclínico de ésta y lograron crear anticuerpos.

De acuerdo con lo anterior, los casos positivos con un 50% y 75% de aglutinación se deben considerar como personas cuyo contacto con la bacteria ha sido más fuerte y constante, pudiéndose llegar a sospechar que éstas personas han presentado la enfermedad y actualmente tienen títulos de anticuerpos-

muy altos.*

En el presente trabajo, se encontró una frecuencia del 11% de casos positivos a leptospira en humanos, mientras que Palacios, (1983) reporta una prevalencia de leptospirosis canina del 29.1%; por otra parte Flores (1979), encontró un 11% de casos positivos a leptospirosis canina (14,28).

Dentro de los serotipos usados para éste trabajo, se encontró que los más frecuentes en la población estudiada fueron: L. hardjo (3 casos); L. canicola (2 casos); L. pyrogenes (3 casos). Mendoza analizó 91 sueros de pacientes ictericos del Centro Médico la Raza para buscar la presencia de leptospirosis, utilizó el método de aglutinación lisis con la técnica de Schüffner y encontró nueve sueros positivos a L. canicola, lo que corresponde al 9.89% de casos positivos (23).

Bravo demostró un caso de L. canicola en un paciente (5).

De L. gryppotyphosa; L. icterohaemorrhagiae; L. australis y L. botaviae se encontraron un caso respectivamente. Varela estudió 1323 sueros humanos originarios de los estados de Oaxaca, Tabasco, Yucatan, Tamaulipas, Baja California Sur, Durango y Distrito Federal, encontró 195 casos positivos y el sero

* Comunicación personal, Dra. Garcia Escamilla Rosa Ma.

Interpretación de la prueba de microaglutinación en el diagnóstico de leptospirosis en humanos. 1984.

tipo más frecuente fué L. icterohaemorrhagiae lo que corresponde al 14.73% de casos positivos (34). Correa de 467 muestras humanas que estudió en la región del Amazonas encontró 40 casos positivos, siendo el serotipo más frecuente: L. gryppotyphosa, correspondiendo al 8.56% de casos positivos (10). De los pacientes que ingresaron al Hospital de Enfermedades Infecciosas de Salvador en el Estado de Bahia, Moreira estudió 888 pacientes de los cuales resultaron 133 positivos, lo que equivale al 14.97% de casos positivos, siendo los serotipos más frecuentes: L. icterohaemorrhagiae; L. autumnalis; L. castellanis; L. gryppothyphosa; L. hebdomadis y L. bataviae (25).

El presente trabajo, coincide en porcentaje de presentación de la enfermedad en humanos, con aquellos trabajos realizados por: Mendoza, Varela y Moreira, en donde la media de la frecuencia es del 11%, mientras que la relación que existe con la frecuencia de la enfermedad en los perros, Flores reporta un porcentaje del 11% y Palacios un 29.1% .

Por otra parte, el presente trabajo, no coincide con lo reportado por Palacios en cuanto al serogrupo más frecuente. El determinó en 112 muestras que los serotipos más frecuentes de leptospira en caninos son: L. canicola; L. tarassovi; y L. icterohaemorrhagiae .

Tomando en cuenta que para la realización de éste trabajo, las muestras fueron tomadas al azar, se encontró que la relación de edades es la siguiente: el 45.45% corresponde a individuos de 8 a 14 años de edad, un 36.36% corresponde a individuos de 30 a 40 años y un 18.18% de muestras sin datos de edad.

Bravo demostró un caso de leptospirosis en un joven de 17 años (5). Da Silva, encontró que en 380 casos positivos en Rio de Janeiro, el promedio de edad de los enfermos era de 33.1 años (12).

De la misma manera, la relación de sexos encontrada en éste trabajo es la siguiente: el 62% de muestras correspondieron a individuos de sexo femenino, un 30% a individuos de sexo masculino y un 8% de muestras sin datos de sexo. Considerando ésto, se tiene el siguiente dato: 9 de las muestras positivas correspondieron a individuos de sexo femenino lo que equivale al 81.81% y dos muestras correspondieron a individuos del sexo masculino que representa el 18.18%. Da Silva entre 1966 y 1970, estudió aspectos epidemiológicos de 380 casos positivos en Rio de Janeiro; concluyó que el 96.1% de los casos positivos correspondían a individuos del sexo masculino (12).

La zona escogida para realizar el muestreo de éste trabajo, aunque presenta todos los servicios del área urbana, es

deficiente en la limpieza de sus calles, el estado de la vivienda de los habitantes de ese lugar; además la población de perros callejeros es alta, siendo posible la transmisión de la leptospirosis por medio de ésta especie.

CONCLUSIONES

Después de haber analizado la procedencia y resultados de las muestras, se observó que los serotipos más frecuentes son: L. hardjo; L. pyrogenes y L. canicola .

Conforme a los índices de positividad observados en perros y humanos, se aprecia que son similares lo que hace pensar que la especie canina fué la que posiblemente infectó al grupo estudiado.

Al observar la relación de edades de las muestras estudiadas, resulta de gran interés para la salud pública el hecho de que un 45.45% de las muestras positivas correspondieron a individuos menores de edad sin distinguir el sexo; sin que ésta condición se requiera para que el ser humano sea susceptible a la infección con éste patógeno.

La población estudiada, fué seleccionada al azar, sin ser representativa de un problema de mayor amplitud. Por lo que se sugiere hacer un muestreo más amplio en diferentes áreas y épocas del año con el fin de establecer la magnitud del problema.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abdussalam M.: Situación Mundial del Problema de la Leptospirosis. Of. Pan. Pub. Cien., 316: 142 - 153 (1976).
- 2.- Anderson D.C., James, G.; Maetz, M; Patton, Ch; & Kaufman, F.: Leptospirosis en Empleados de un Zoológico. Am J. of Trop. Med. Hyg. 27 1: 210 - 211 (1978).
- 3.- Andress, C.E; Greenfield, J. & Mac Donald, K.: Some Leptospira agglutination detected in domestic animals in British Columbia. Can. J. of Com. Med. 40: 215 - 217 (1976).
- 4.- Bishop, S.; Syrandberg, J.; Adams, L.; Brownstein, L. & Patterson, A.: Chronic Active hepatitis in dogs associated with leptospire. Am. J. Vet. Res. 40: 839-844 (1979)
- 5.- Bravo C.: Leptospirosis Humana en Colombia. Zoonosis, (1970 - 1971) 186.
- 6.- Buxton, A.: Animal microbiology 2nd Edition Blackwell Sci. Oxford (1977) Vol. II.
- 7.- Carter, G.R.: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology Springfield II Tho. 1967; 2^a Ed.
- 8.- Centro Panamericano de Zoonosis: Leptospirosis en el Hombre, Barvados. Gen. Pan. de Zoon. 14: 10 (1972).

- 9.- Centro Panamericano de Zoonosis: Métodos de Laboratorio para leptospirosis. Cen. Pan. de Zoon. 9: 10 (1972).
- 10.- Correa, M.: Human leptospirosis in Brazil. Int. J. Zoon. 2: 1 - 9 (1975).
- 11.- Davis B.D.: Microbiology. Thirth edition. Harper & Row Publishers (1980).
- 12.- Da Silva, M.: Aspectos epidemiológicos das Leptospiroses Humans no Grande Rio Brazil. Cen. Pan. de Zoon. 1: 122 - 133 (1974).
- 13.- Dikken, K.: Leptospirosis. Boletín Técnico de la D.G.S.A. S.A.G. (1976).
- 14.- Flores Castro, R.; Uruchurtu, M.; Ruiz Skewes, H. & Ordoñez Ma.: Un estudio de 50 necropsias en perros callejeros. Rev. Vet. Mex. 131 - 139 (1977).
- 15.- Fresh, J.: Leptospirosis in Man and Rodents on Taiwan. Am. J. Trop. Med. and Hyg., 17 5: 760 - 768 (1968).
- 16.- Fuentes R.M.: Cálculo de la población canina en la Ciudad de México. Determinación de sus condiciones de atención y destino. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1979.

- 17.- González L. G.: Exploración serológica de anticuerpos contra Leptospira canicola en perros por el método de aglutinación en tubo capilar. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1965.
- 18.- Hagan, W.B.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. La Pren. Med. Mex. 3^a Ed. México (1970).
- 19.- Harrington, R.: Leptospiral antibodies in serum from cattle, swine, horse, deer, sheep and goats, (1973-1974). Am. J. Vet. Res. 36: 1367-1370 (1975).
- 20.- Higgins R. & Cayouette P.: Serological diagnosis of Leptospirosis in the province of Quebec. Can.Vet. J. 19: 13 - 19 (1978).
- 21.- Maillous, M.: Leptospirosis - Zoonosis. Int. J. of Zoo. 2: 45-54 (1975).
- 22.- Martone, W. J. & Kaufmann, L.: Leptospirosis in the United States 1974-1978; from the Center for Diseases Control. J. Infect. Dis. 140: 1020-1022 (1979).
- 23.- Mendoza, R.: Estudio de leptospirosis en la Ciudad de México. Rev. del Inst. de Sal. y Enf. Trop. XVIII, 1: 37-39 (1958).

- 24.- Monlux, W.S.: Leptospirosis - The Clinical Pathology of Canine leptospirosis 7^a Ed. The Iowa State University Press., Ames, Iowa U.S.A. 1965.
- 25.- Moreira, E. & Morilena, S.: Leptospirosis in the city of Salvador Bahia, Brazil. Int. J. Zoon., 6: 85-96 (1979).
- 26.- Morrison, W.I. & Wright, N.G.: Canine Leptospirosis immunopathological study of interstitial nephritis due to Leptospira canicola. J. Path. 120: 83-89 (1979).
- 27.- Myers, D.: Aislamiento de Leptospira fort-bragg de una rata en Barbados. Gen. Pan. de Zoon.: 254-257 (1976).
- 28.- Palacios, J.: Aislamiento de leptospiras a partir de riñones de perro. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1983.
- 29.- Rocas, T.E.: Investigación de leptospiras en ratas (Rattus norvegicus) y aguas de albañal. Tesis para examen profesional. Inst. Polit. Nac. México D.F. 1954.
- 30.- Sostaric, R.B.: Patología de 50 ratas atrapadas en el Rastro de Ferrería de la Ciudad de México. Tesis de maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1981.

- 31.- Sullivan, N.D.: Leptospirosis in animals and man. Aust. Vet. J. 50: 216-222 (1974).
- 32.- Syfress, B.: Leptospirosis como problema de salud humana y animal en America Latina y el área del Caribe. Of. Pan San. Pub. Cient., 316: 125-141 (1976).
- 33.- Varela, G.M.: Estudio de la leptospirosis en la Ciudad de Veracruz, Tampico y México de la República Mexicana. Rev. del Inst. de Sal. y Enf. Trop. 14: 123-131 (1954).
- 34.- Varela, G.M.: Investigación de aglutininas para L. ictero-haemorrhagiae, L. pomona, L. canicola en sueros de humanos y de animales de diversos estados de la República Mexicana. Rev. del Inst. de Sal. y Enf. Trop. XVII, 1: 31 - 35 (1958).
- 35.- Varela, G.M.: Estudio serológico de leptospirosis en la República Mexicana. Rev. del Inst. de Sal. y Enf. Trop. XXI, 1-2: 49-52 (1961).
- 36.- Varela, G.M.: Investigación serológica de la leptospirosis en la República Mexicana en animales. Rev. del Inst. Sal. Pub. XXIX 1: 101 - 103 (1969).